

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Imunologie



Mgr. Michaela Hájková

**Terapeutický potenciál mezenchymálních kmenových buněk v myším
experimentálním modelu**

The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in a mouse experimental model

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha 2017

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha 13. 7. 2017

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D., za věnovaný čas, odborné vedení doktorského projektu, a především za optimistický a motivační přístup. Dále děkuji prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc., za odborné konzultace, Mgr. Elišce Javorkové, Ph.D., Mgr. Peteru Trošanovi a Mgr. Barboře Heřmánkové za všestrannou podporu a pomoc, dále RNDr. Aleně Zajícové, CSc., Lucii Holáňové, Jaroslavě Knížové a všem ostatním členům laboratoře. Velké díky patří mému manželovi a všem mým blízkým za podporu, pochopení a trpělivost.

Abstract

Due to their immunomodulatory and regenerative potential, mesenchymal stem cells (MSCs) represent a promising therapeutic tool for cell-based therapy, organ transplantation or tissue engineering. To improve clinical applicability of MSCs, new methods to increase their delivery and efficacy have been tested in the latest years but the mechanism of observed alterations has not yet been described.

In the present project we focused on studying the effect of several factors that can significantly affect the therapeutic success of MSC-based treatment. Initially, we analysed the therapeutic effect of MSCs applied locally on nanofiber scaffold with incorporated cyclosporine A (CsA) in a mouse model of allogeneic skin transplantation. Our results indicate that application of MSCs in the presence of CsA direct M1/M2 macrophage polarization towards regulatory phenotype. This phenotype switching is accompanied by decreased production of nitric oxide (NO) and interferon γ (IFN- γ) and increase production of interleukin 10 (IL-10), and may result in suppression of the local inflammatory reaction.

The next goal of proposed study was to analyse the effect of the treatment based on MSCs combined with immunosuppressive drugs with different mechanism of action on the balance among distinct T cell subpopulations. We demonstrated that MSCs attenuate the adverse effects of immunosuppressive drugs, and in combination with these drugs modulate cell activation and apoptosis. This combining treatment favourably influence immune balance by harnessing the T helper 1 (Th1), Th2, Th17 and cytotoxic T lymphocyte phenotype while preserving the anti-inflammatory regulatory T cell-related response.

We have also shown that systemically administered MSCs specifically migrate to the alkali-burned eye and attenuate the early inflammatory environment. From all tested types of MSCs (untreated or pretreated with IFN- γ , transforming growth factor- α or IL-1), MSCs pretreated with IFN- γ were the most potent in inhibiting the acute phase of inflammation, decreasing infiltration by myeloid and lymphoid cells, and the local production of IL-1 α , IL-6 and NO.

Abstrakt

Díky svému imunomodulačnímu a regenerativnímu potenciálu představují mezenchymální kmenové buňky (MSCs, mesenchymal stem cells) slibný terapeutický prostředek pro buněčnou terapii, transplantace orgánů a tkáňové inženýrství. V posledních letech bylo testováno mnoho metod pro zlepšení klinické použitelnosti MSCs, ale přesný mechanismus pozorovaných efektů ještě nebyl popsán.

V předkládané práci jsme se zaměřili na studium několika faktorů, které mohou terapeutickou úspěšnost MSCs významně ovlivnit. Nejprve jsme na myším modelu transplantace alogenní kůže analyzovali terapeutický efekt MSCs aplikovaných lokálně na nanovlákněných nosičích s inkorporovaným cyklosporinem A (CsA). Naše výsledky ukázaly, že aplikace MSCs a CsA směřuje M1/M2 polarizaci makrofágů směrem k regulačnímu fenotypu. Tato změna fenotypu je doprovázena sníženou produkcí oxidu dusnatého (NO) a interferonu γ (IFN- γ) a zvýšenou produkcí IL-10 a může vést k potlačení lokální zánětlivé reakce.

Dalším cílem předkládané studie bylo analyzovat efekt podání MSCs v kombinaci s imunosupresivními látkami s různým mechanismem účinku na rovnováhu mezi jednotlivými populacemi T lymfocytů. Ukázali jsme, že MSCs snižují nežádoucí účinky imunosupresivních látek a v kombinaci s těmito léky modulují aktivaci a apoptózu buněk. Tento kombinovaný přístup ovlivňuje imunitní rovnováhu potlačením pomocných (Th, T helper) Th1, Th2, Th17 a cytotoxických T lymfocytů a zároveň podporuje protizánětlivou imunitní odpověď spojenou s regulačními T lymfocyty.

Ukázali jsme také, že systémově podané MSCs specificky migrují do oka poraněného hydroxidem a zmírňují časné zánětlivé prostředí. Ze všech testovaných typů MSCs (neovlivněné MSCs, MSCs ovlivněné IFN- γ , faktorem nekrotizujícím nádory- α nebo IL-1) představují MSCs preinkubované s IFN- γ nejúčinnější přístup pro potlačení akutní fáze zánětu, snížení infiltrace myeloidními i lymfoidními buňkami a snížení lokální produkce IL-1 α , IL-6 a NO.

Obsah

1	Seznam zkratk.....	7
2	Literární přehled	9
2.1	Úvod.....	9
2.2	Mezenchymální kmenové buňky	9
2.2.1	Zdroje a charakterizace MSCs.....	10
2.2.2	Interakce mezi MSCs a buňkami imunitního systému	12
2.2.3	Cytoprotektivní, antiapoptotické a trofické vlastnosti MSCs.....	21
2.3	Terapeutické využití MSCs.....	23
2.3.1	Možnosti aplikace MSCs a jejich migrace	25
2.3.2	Přežívání a imunogenicita aplikovaných MSCs	26
2.3.3	Faktory, které mohou ovlivnit úspěšnost aplikace.....	28
2.3.4	Cílené ovlivňování imunomodulačních schopností MSCs.....	29
3	Cíle práce.....	36
4	Seznam vlastních publikací	38
4.1	Seznam použitých publikací	38
4.2	Seznam ostatních publikací.....	38
5	Výsledky.....	39
5.1	Lokální aplikace mezenchymálních kmenových buněk a cyklosporinu A snižuje imunitní odpověď prostřednictvím změny fenotypu makrofágů	39
5.2	Mezenchymální kmenové buňky zeslabují nežádoucí účinky imunosupresivních látek na různé populace T buněk.....	50
5.3	Modulace časného zánětlivého mikroprostředí v poškozeném oku pomocí systémově podaných MSCs stimulovaných IFN- γ	63
6	Diskuze.....	75
7	Závěry.....	81
8	Reference.....	83

1 Seznam zkratek

APC	antigen presenting cells, buňky prezentující antigen
Arg	arginase, argináza
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
COX	cyklooxygenase, cyklooxygenáza
CsA	cyclosporin A, cyklosporin A
CTLA	cytotoxic T lymphocyte associated protein
Dex	dexamethasone, dexametazon
DC	dendritic cells, dendritické buňky
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis, experimentální autoimunitní encefalomyelitida
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
Fas-L	Fas ligand
Foxp3	forkhead box proteins 3
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, faktor stimulující kolonie makrofágů a monocytů
GVHD	graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA	human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen
HO	hemoxygenase, hemoxygenáza
HSCs	hematopoietic stem cells, hematopoetické kmenové buňky
ICAM	intercellular adhesive molecule, mezibuněčná adhezivní molekula
IDO	indoleamin 2,3 dioxygenáza
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin, imunoglobulin
IGF	insulin-like growth factor, inzulínu podobný růstový faktor
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxid synthase, indukovatelná syntáza oxidu dusného
LFA	leucocyte-function-associated antigen, adhezivní molekula leukocytů
LIF	leukemia inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor

LNCs	lymph node cells, buňky lymfatických uzlin
LSCs	limbal stem cells, limbální kmenové buňky
MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MIF	macrophage migration inhibitory factor, inhibiční faktor migrace makrofágů
MLC	mixed lymphocyte culture, směsná lymfocytární kultura
MMF	mycophenolate mofetil, mykofenolát mofetil
MSCs	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
NO	oxid dusnatý
NK	natural killers, přirození zabíječi
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězcová reakce
PGE	prostaglandine E, prostaglandin E
Pred	prednisone, prednizon
Rapa	rapamycine, rapamycin
ROR γ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
SLE	systemic lupus erythematosus, systémový lupus erythematosus
SOD	super oxid dismutase, super oxid dismutase
Tac	tacrolimus, takrolimus
Tc	cytotoxic T cells, cytotoxické T lymfocyty
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
Th	helper T cells, pomocné T lymfocyty
TLR	Toll-like receptors
TNF	tumor necrosis factor, faktor nekrotizující nádory
TNTs	tunneling nanotubes
Treg	regulatory T cells, regulační T lymfocyty
TSG-6	TNF- α stimulated gene 6 protein
VCAM	vascular cell adhesion molecule, cévní adhezivní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor, cévní endoteliální růstový faktor
VLA	very late antigen, pozdní aktivační antigen

2 Literární přehled

2.1 Úvod

Léčba založená na kmenových buňkách zaznamenala v posledních letech velký rozvoj a je předmětem zájmu mnoha studií. S ohledem na některé komplikace spojené s etickými problémy využívání embryonálních kmenových buněk nebo s nízkou účinností reprogramování a hrozbou tumorogeneze u indukovaných pluripotentních kmenových je velká naděje vkládána do buněk izolovaných z dospělého organismu. Mezi nimi vynikají mezenchymální kmenové buňky (MSCs, mesenchymal stem cells), a to především širokým spektrem použitelnosti a dostupností. Díky svým pleiotropním schopnostem – antiapoptotickým, cytoprotektivním, imunomodulačním a diferenciačním – představují MSCs unikátní prostředek pro buněčnou terapii. Výsledky experimentálních zvířecích modelů, preklinických i klinických studií ukazují na možnost využití MSCs při potlačení mnoha nežádoucích imunitních reakcí i v regenerativní medicíně.

Na základě současných znalostí je ale zřejmé, že pro úspěšnou terapeutickou aplikaci je třeba zvážit účinek mnoha faktorů, které mohou terapeutické vlastnosti MSCs významně ovlivnit. Tato práce se zabývá především studiem možností cíleně podpořit a zvýšit efekt MSCs v *in vitro* i *in vivo* podmínkách. Jako velice atraktivní a perspektivní se jeví především aktivace MSCs preinkubací s cytokiny a ligandy Toll-like receptorů (TLR), nebo kultivace v hypoxických podmínkách. Výhodné by mohlo být rovněž současné podání imunosupresivních látek, využití biokompatibilních nosičů nebo genetické manipulace.

Modifikace nebo podpora vlastností MSCs by mohla napomoci překonat limitace spojené s buněčnou terapií, jež je na těchto buňkách založena. Patří mezi ně nízká životnost a omezená schopnost buněk migrovat po aplikaci pouze do cílového místa nebo nedostatečné imunomodulační schopnosti v nepříznivém mikroprostředí. Vývoj nových terapeutických strategií může vést k úspěšnějšímu využití MSCs při léčbě mnoha akutních i chronických závažných onemocnění.

2.2 Mezenchymální kmenové buňky

MSCs byly poprvé charakterizovány v roce 1966, kdy je Friedenstein *et al.*, popsali jako dlouhožijící adherentní fibroblastické buňky s osteogenním potenciálem získané z kostní dřeni. V roce 1991 pak získaly na významnosti na základě studie A. Caplana, který je

popsal jako buňky schopné napomáhat udržení a regeneraci mezenchymálních tkání v organismu (Caplan, 1991). V současné době jsou MSCs popisovány jako heterogenní populace multipotentních kmenových buněk, kterou je možné získat z mnoha tkání organismu a která má kromě diferenciacích schopností i cytoprotektivní, antiapoptotické a imunomodulační vlastnosti. Velkou výhodou využití MSCs je fakt, že na rozdíl od embryonálních kmenových buněk v souvislosti s jejich získáním a aplikací nevystávají etické problémy.

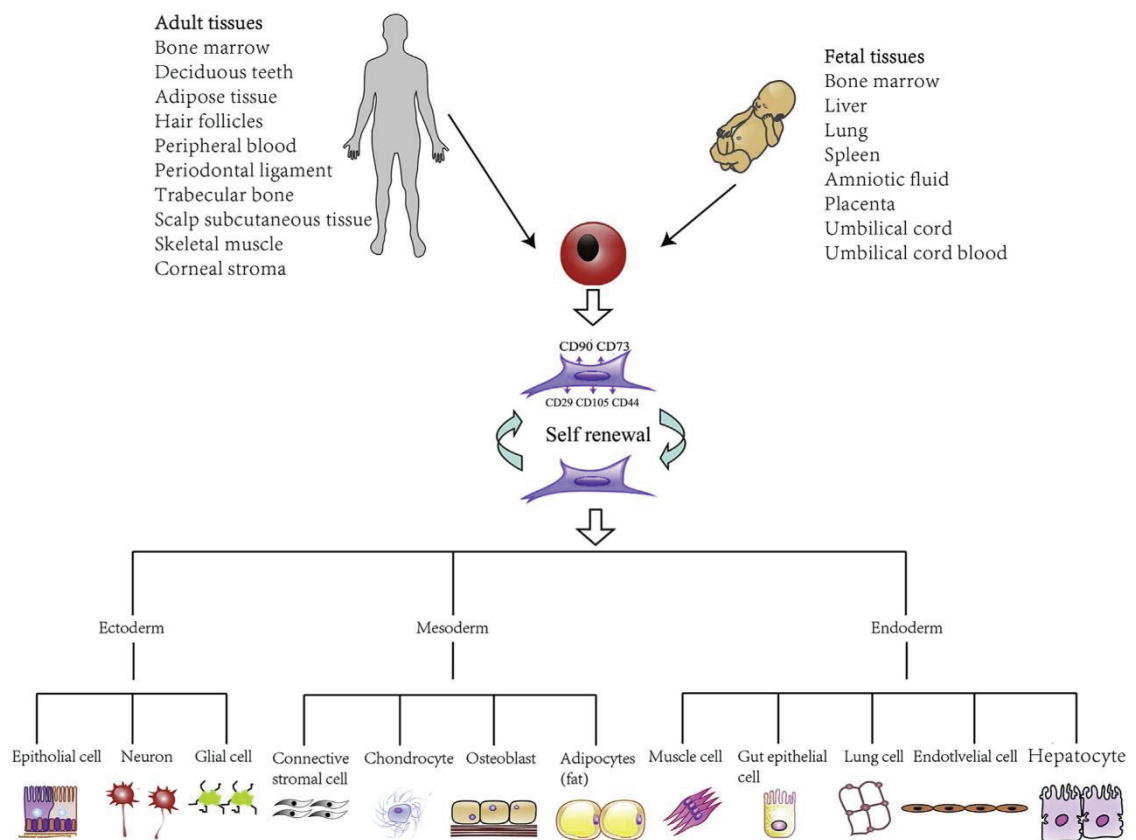
2.2.1 Zdroje a charakterizace MSCs

Na rozdíl od ostatních kmenových buněk nemají MSCs svoji jedinečnou niku a nacházejí se v perivaskulárním prostoru různých tkání organismu. Jejich hlavní úlohou je udržování homeostázy, regenerace tkáně a regulace imunitní odpovědi. Díky schopnosti produkovat růstové faktory a diferencovat v endotelové buňky, pericyty, osteocyty a stromální buňky hrají MSCs důležitou roli také ve vytváření niky pro hematopoetické kmenové buňky (HSCs, hematopoietic stem cells). Kromě kostní dřeně je možné MSCs nalézt i v mnoha dalších tkáních, jako jsou periferní krev, lymfatické uzliny, kosterní sval, vlasový folikul nebo v placentě a některých fetálních tkáních (Muguruma *et al.*, 2006, Park *et al.*, 2015, Glenn and Whartenby 2014, Zhao *et al.*, 2016).

Jedním z nejstudovanějších zdrojů MSCs je kostní dřeň. Získávání MSCs z kostní dřeně je ale poměrně invazivní, a proto je vyvíjena snaha najít jiné vhodný zdroj. Slibnou alternativou je například tuková tkáň nebo pupečnicková krev, a to především díky poměrně snadné dostupnosti a velké výtěžnosti (Kern *et al.*, 2006, Ribeiro *et al.*, 2013). MSCs se v *in vitro* podmínkách už po první pasáži množí exponenciálně a představují velice atraktivní populaci kmenových buněk i pro svou schopnost adherovat k plastu, čehož se využívá při jejich izolaci a následné kultivaci.

Vzhledem k tomu, že zatím nebyl popsán unikátní marker MSCs, využívá se k jejich charakterizaci soubor pozitivních a negativních markerů, popis fenotypu a ověření schopnosti diferenciaci. Podle Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii je lidské MSCs možné definovat na základě tří minimálních kritérií (Dominici *et al.*, 2006). MSCs kultivované za standardních podmínek jsou adherentní, exprimují diferenciací antigeny (CD, cluster of differentiation) CD73, CD90 a CD105 a neexprimují CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α a lidský leukocytární antigen DR (HLA-DR, human leukocyte antigen-DR). Navíc jsou MSCs ve vhodných *in vitro* podmínkách schopné diferencovat v adipocyty, osteoblasty a chondroblasty.

Dále se ukazuje, že za určitých podmínek mohou MSCs transdiferencovat také v buňky endodermální tkáně (plicní buňky, svalové buňky, epitelové buňky střeva, hepatocyty) a ektodermu (epiteliální buňky, neurony, gliové buňky) (obr. 1). I diferencované MSCs si za určitých podmínek mohou zachovat některé svoje imunomodulační účinky. Trosan *et al.* (2016) zjistili, že působení inzulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1, insulin-like growth factor 1) zvyšuje u MSCs expresi znaků rohokových buněk a že tyto MSCs jsou i nadále schopny tlumit produkci cytokinů aktivovanými T lymfocyty.



Obr. 1. Zdroje a charakterizace MSCs. MSCs je možné izolovat z mnoha tkání dospělého organismu, jako jsou kostní dřeň, tuková tkáň, vlasové folikuly, kosterní sval nebo periferní krev. Kromě toho je možné tyto buňky nalézt i ve fetálních tkáních. Charakteristickými znaky pro MSCs je jejich schopnost adherovat k plastu, sebeobnova a soubor pozitivních a negativních markerů. MSCs tvoří multipotentní populaci kmenových buněk, které mohou ve vhodných podmínkách diferencovat v buňky ektodermálních, mezodermálních i endodermálních tkání. (převzato a upraveno z Zhao et al., 2016)

Je důležité zmínit, že MSCs tvoří fenotypově heterogenní buněčnou populaci, která zahrnuje prekurzory adipocytů, fibroblastů a zárodečné endoteliální buňky kostní dřeně (Muraglia *et al.*, 2000, Dominici *et al.*, 2009). Navíc se během doby kultivace mohou snižovat diferenciační (Muraglia *et al.*, 2000) i imunosupresivní vlastnosti MSCs a zároveň zvyšovat jejich imunogenicita (Liu *et al.*, 2012). Také podmínky dlouhodobé kultivace mohou ovlivňovat vlastnosti MSCs (Wang *et al.*, 2013, Gu *et al.*, 2016). Kromě toho se MSCs mohou částečně lišit svými imunomodulačními vlastnostmi i v závislosti na tkáni, ze které byly izolované. Například Ribeiro *et al.* (2013) zjistili, že MSCs získané z tukové tkáně mají větší inhibiční efekt na aktivaci NK buněk (natural killers) a CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů z periferní krve než buňky izolované z kostní dřeně nebo pupečnickové krve. Znalost těchto drobných rozdílů může napomoci vybrat a optimalizovat nejvhodnější postup pro využití MSCs v jednotlivých studiích v závislosti na požadovaném účinku.

2.2.2 Interakce mezi MSCs a buňkami imunitního systému

Přestože je v současnosti popsáno velké množství solubilních i membránových faktorů, které se podílejí na regenerativních a protizánětlivých schopnostech MSCs, přesné mechanismy působení nejsou zcela objasněny. MSCs ovlivňují buňky imunitního systému solubilními faktory, bylo však prokázáno, že když dochází i k přímému mezibuněčnému kontaktu, jejich imunosupresivní působení se zvětšuje (Jiang *et al.*, 2005, Spaggiari *et al.*, 2006, Di Trapani *et al.*, 2016).

Mezi solubilní imunomodulační molekuly se řadí oxid dusnatý (NO) produkovaný inducibilní syntázou NO (iNOS), interleukin-6 (IL-6), IL-10, transformující růstový faktor β (TGF- β , transforming growth factor β), prostaglandin E2 (PGE2) produkovaný cyklooxygenázou 2 (COX2), HLA-G5, chemokiny, TSG-6 (TNF- α stimulated gene 6 protein) nebo růstový faktor hepatocytů (HGF, hepatocyte growth factor). Dalšími důležitými proteiny jsou intracelulární enzym indolamin 2,3-dioxygenáza (IDO) a hemoxygenáza-1 (HO-1). Mezi povrchové molekuly patří ligandy proteinu programované buněčné smrti 1 a 2 (PD-L1/2, programmed death-ligand 1/2) nebo Fas ligand (Fas-L). V poslední době se do popředí zájmu dostává další způsob, kterým mohou MSCs působit na svoje okolí a imunitní odpověď, jímž jsou exosomy – extracelulární váčky, které mohou s cílovými buňkami interagovat pomocí receptorů; kromě toho mohou obsahovat růstové faktory, cytokiny, nukleové kyseliny a další imunomodulační a trofické faktory (Di Trapani *et al.*, 2016, Merino-Gonzalez *et al.*, 2016).

MSCs mají schopnost modulovat jak vrozenou, tak adaptivní imunitní odpověď, přičemž jejich vliv může být buď přímý, nebo zprostředkovaný. V *in vitro* i *in vivo* podmínkách inhibují proliferaci a maturaci buněk imunitního systému a směřují imunitní odpověď k protizánětlivé tolerantní odpovědi na antigeny.

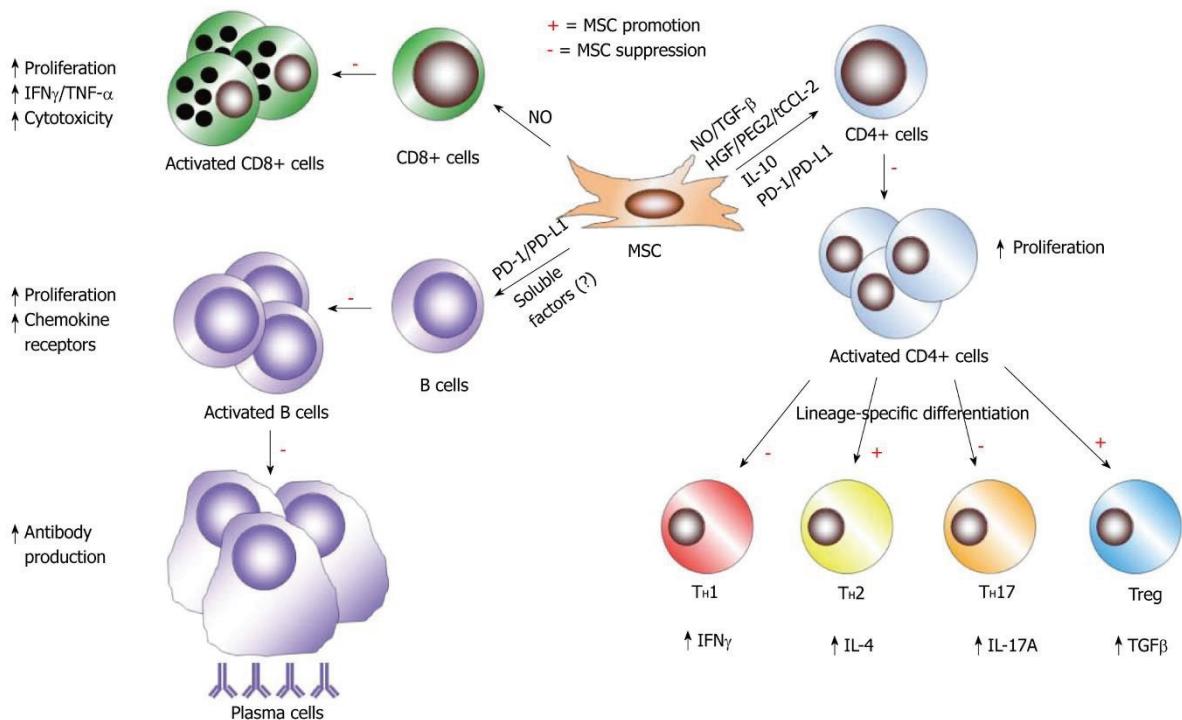
2.2.2.1 T lymfocyty

T lymfocyty hrají klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi, a to především prostřednictvím sekrece cytokinů a řízení dalších efektorových buněk. MSCs mají schopnost inhibovat proliferaci T lymfocytů (Le Blanc *et al.*, 2004a, Rasmusson *et al.*, 2005). Tento efekt je nezávislý na hlavním histokompatibilním komplexu I (MHC, major histocompatibility complex) (Krampera *et al.*, 2003), ale podílí se na něm povrchové i solubilní molekuly, jako jsou PD-L1, PD-L2, Fas-L (Augello *et al.*, 2005, Gu *et al.*, 2013), PGE-2 (Aggarwal and Pittenger, 2005), NO (Ren *et al.*, 2010), TGF- β a HGF (Di Nicola *et al.*, 2002) a aktivitaIDO (Krampera *et al.*, 2006). Pro inhibici T buněk pomocí MSCs je charakteristické nevratné zastavení buněčného cyklu T lymfocytů ve fázi G0/G1, snížení produkce interferonu gamma (IFN- γ) a dále reverzibilní potlačení aktivace a s tím spojená snížená exprese CD25, CD38 a CD69 (Le Blanc *et al.*, 2004a, Glennie *et al.*, 2005). Neméně důležitou schopností MSCs je potenciál podporovat diferenciaci a funkce protizánětlivých subpopulací T buněk.

MSCs mohou imunitní odpověď regulovat také tím, že brání apoptóze T lymfocytů. Normanton *et al.* (2014) pozorovali zvýšenou expresi receptoru pro IL-7 (CD127) na buňkách kultivovaných společně s MSCs a současně detekovali produkci tohoto cytokinu MSCs. Dalším cytokinem podílejícím se na ochraně T buněk před apoptózou je IL-6 produkovaný MSCs (Xu *et al.*, 2007). Na aktivovaných T lymfocytech se v přítomnosti MSCs snižuje exprese Fas a Fas-L, díky čemuž MSCs brání aktivaci indukované buněčné smrti (Benvenuto *et al.*, 2007). V určitých podmínkách však mohou mít MSCs i zcela opačný účinek. V závislosti na použitých buňkách, počtu MSCs a stimulaci může působením MSCs docházet ke zvýšení exprese PD-1 na T lymfocytech, což má za následek potlačení proliferace, nebo dokonce apoptózu buněk (Yan *et al.*, 2014).

Právě díky tomu, že MSCs dokážou modulovat rovnováhu a funkce pomocných T lymfocytů (Th, helper T cells) Th1/Th2/Th17, regulačních T lymfocytů (Treg, regulatory T cells) a cytotoxických T lymfocytů (Tc, cytotoxic T cells) (Svobodova *et al.*, 2012, Mohammadzadeh *et al.*, 2014) (obr. 2), představuje buněčná terapie využívající tyto buňky

atraktivní alternativu pro léčbu mnoha zánětlivých a autoimunitních onemocnění, při protinádorové terapii a v transplantační medicíně.



Obrázek 2. Vliv MSCs na buňky adaptivní imunity. MSCs působí na regulaci T a B lymfocytů prostřednictvím povrchových molekul, jako je PD-L1, ale i solubními molekulami, mezi které patří NO, TGF- β , HGF, mpCCL-2 a IL-10. U CD8⁺ T lymfocytů se vlivem MSCs snižuje proliferace, produkce cytokinů a cytotoxicita. B buňky snižují expresi chemokininových receptorů, proliferaci a také diferenciaci na plazmatické buňky a produkci protilátek. MSCs mají schopnost snižovat proliferaci a regulovat rovnováhu mezi jednotlivými subpopulacemi CD4⁺ T lymfocytů. U Th1 a Th17 buněk se vlivem MSCs snižuje produkce IFN- γ resp. IL-17 a u Th2 a Treg naopak dochází k vyšší produkci IL-4 resp. IL-10. (převzato a upraveno z Glenn and Whartenby, 2014)

Th1/Th2 lymfocyty

Bylo popsáno, že MSCs snižují efektorové funkce Th1 lymfocytů a jejich produkci IFN- γ a zároveň zvyšují produkci IL-4 a IL-10 Th2 buňkami. MSCs dokážou tuto rovnováhu mezi zánětlivou na protizánětlivou imunitní odpovědí ovlivňovat i nepřímo, a to působením na expresi kostimulačních molekul a produkci cytokinů dendritickými buňkami (DC, dendritic cells) (Aggarwal and Pittenger, 2005, Glennie *et al.*, 2005).

Aplikace MSCs může být vhodná i při léčbě onemocnění spojených naopak s nárůstem počtu a aktivity Th2 buněk, jako jsou systémový lupus erythematosus (SLE)

nebo alergická reakce. Bylo zjištěno, že v těchto případech mají MSCs schopnost efektivně snižovat počet nepřiměřeně aktivovaných Th2 lymfocytů i jejich produkci IL-4 (Zhou *et al.*, 2008a, Kavanagh and Mahon, 2011).

Treg/Th17 lymfocyty

Dalším mechanismem, kterým se MSCs podílejí na regulaci imunitní odpovědi, je jejich schopnost ovlivňovat diferenciaci stimulovaných T lymfocytů na tolerogenní Treg nebo prozánětlivě působící Th17 buňky. Naivní T buňky v přítomnosti TGF- β exprimují jak transkripční faktor nezbytný pro diferenciaci Th17 buněk – ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t), tak Treg lymfocytů – Foxp3 (forkhead box proteins 3). Při vysokých koncentracích TGF- β dochází v naivních buňkách k potlačení exprese receptoru pro IL-23 a inhibici funkce ROR γ t, v důsledku čehož se preferenčně vyvíjejí Treg lymfocyty. Naopak nižší koncentrace TGF- β a přítomnost IL-6, IL-21 a IL-23 indukují diferenciaci ve směru Th17 buněk (Zhou *et al.*, 2008b). MSCs hrají důležitou roli v regulaci vzniku Treg i Th17 lymfocytů. Díky své schopnosti produkovat cytokiny důležité pro diferenciaci obou těchto populací – TGF- β a IL-6 – mohou v závislosti na svém mikroprostředí ovlivňovat to, jakým směrem bude diferenciace probíhat (Svobodova *et al.*, 2012). Dalším mechanismem, kterým mohou MSCs ovlivňovat diferenciaci Th lymfocytů, je produkce chemokinu MCP-1, který v naivních lymfocytech aktivuje fosfatázy inhibující diferenciaci Th17 i Th1 lymfocytů (Rafei *et al.*, 2009). MSCs mohou napomáhat diferenciaci Treg i pomocí dalších solubilních molekul, jako jsou PGE2, HLA-G5, IL-10, nebo exprese IDO (Selmani *et al.*, 2008, English *et al.*, 2009, Ghannam *et al.*, 2010, Ka-Fai Ma and Chan, 2016). Mezi další funkce MSCs patří také jejich schopnost zvýšit produkci IL-10 Treg lymfocyty (Maccario *et al.*, 2005).

Do rovnováhy mezi Th17/Treg buňkami mohou MSCs zasahovat i prostřednictvím přímého buněčného kontaktu. Bylo prokázáno, že vlivem prozánětlivých podnětů dochází na MSCs ke zvýšení exprese CD54 (receptoru pro CD11a/CD18 exprimovanému Th17 lymfocyty), což má za následek indukci regulačního fenotypu v Th17 buňkách spojenou se sníženou produkcí prozánětlivých cytokinů IL-17, IL-22 a faktoru nekrotizujícího nádory α (TNF- α , tumor necrosis factor) (Ghannam *et al.*, 2010).

V neposlední řadě pak mohou MSCs ovlivňovat diferenciaci Treg lymfocytů i působením na buňky prezentující antigen (APC, antigen presenting cells). Vlivem MSCs se zvyšuje počet regulačních makrofágů (Kim and Hematti, 2009, Cho *et al.*, 2014), B lymfocytů (Peng *et al.*, 2015, Chao *et al.*, 2016) a nematurovaných DC (Maccario *et al.*,

2005), což může mít za následek indukci Treg. Dalším mechanismem vedoucím k potlačení imunitní odpovědi je přímo vyvolání apoptózy autoreaktivních T buněk přes Fas-L na MSCs; apoptické buňky pak indukují produkci TGF- β makrofágy a tím podporují vývoj Treg (Akiyama *et al.*, 2012).

Tc lymfocyty

Úkolem cytotoxických lymfocytů je v první řadě rozpoznání a likvidace infikovaných, nádorových nebo jinak poškozených buněk, jejich nadměrná aktivita však může být nebezpečnější než samotný podnět, který jejich aktivaci vyvolal. MSCs mají schopnost inhibovat vznik cytotoxických buněk, jejich vliv na už aktivované buňky je ale omezený (Rasmusson *et al.*, 2003). Hlavním mechanismem jejich působení jsou především solubilní molekuly PGE2, IDO a TGF- β spolu s přímým mezibuněčným kontaktem, které mají za následek snížení proliferace a produkce cytokinů Tc. Vlivem MSCs dochází rovněž ke snížení exprese aktivačního receptoru NKG2D Tc buňkami (Li *et al.*, 2014b).

Dalším způsobem, který se uplatňuje v regulaci Tc je schopnost MSCs na povrchu monocytů inhibovat expresi kostimulačních molekul, a naopak podporovat inhibiční receptory, což vede k indukci tolerogenního fenotypu Tc. Tento fenotyp je spojen se snížením exprese molekuly CD8 na Tc, s nižší produkcí IFN- γ a granzymu B a nízkou expesí CD28, CD44 a CD95. Bylo rovněž zjištěno, že pro tento efekt je důležitý přímý buněčný kontakt monocytů a Tc, ale tolerogenní fenotyp monocytů je indukován i v kultuře, kde jsou MSCs odděleny od ostatních buněk polopropustnou membránou (Hof-Nahor *et al.*, 2012).

2.2.2.2 B lymfocyty

Další součástí adaptivní imunity jsou B lymfocyty odpovědné za produkci protilátek, cytokinů a prezentaci antigenů. Bylo prokázáno, že MSCs mohou potlačovat proliferaci B lymfocytů, produkci TNF- α a bránit jejich diferenciaci v plazmatické buňky, ale neindukují apoptózu (obr. 2) (Corcione *et al.*, 2006, Asari *et al.*, 2009, Collins *et al.*, 2015). Stejně jako u T lymfocytů dochází i u B buněk k zastavení v G1/G0 fázi buněčného dělení. Mezi molekuly zprostředkovávající inhibici aktivace a proliferace B lymfocytů patří zejména TGF- β , PD-L1 a PD-L2 (Augello *et al.*, 2005). MSCs mají schopnost efektivně inhibovat produkci imunoglobulinů (Ig) IgM, IgG a IgA, dále snižovat expresi chemokinových receptorů CXCR4, CXCR5 a CCR7 a tím ovlivňovat chemotaktické vlastnosti B lymfocytů (Corcione *et al.*, 2006). Zároveň se zdá, že působením MSCs se

nemění schopnost prezentovat antigen, protože není ovlivněna exprese kostimulačních molekul CD40, CD80/86 ani MHCII. Část těchto silných inhibičních efektů však může být způsobena nefyziologickým a v *in vivo* systému nedosažitelným poměrem 1:1 (MSCs : B lymfocyty) použitým ve výše zmíněné práci a tím, že při nižších koncentracích MSCs bude efekt pravděpodobně menší (Rasmusson *et al.*, 2007).

Snížení koncentrace IgM a IgG1 bylo pozorováno i v *in vivo* modelu, kdy byl myším imunizovaným na T buňkách závislým i T buňkách nezávislým antigenem aplikován supernatant z kultur MSCs (Asari *et al.*, 2009). Lze tedy shrnout, že výsledný efekt záleží na množství použitých MSCs, uplatňuje se jak přímý buněčný kontakt, tak solubilní molekuly. Další možností regulace B lymfocytů MSCs je nepřímé ovlivnění zprostředkované Th lymfocyty. Franquesa *et al.* (2015) popsali zpětovazebnou smyčku, podle které aktivace T lymfocytů vede k zvýšení produkce IFN- γ , což má za následek aktivaci MSCs, které pak inhibují T i B lymfocyty.

Aplikace MSCs tak představuje velmi nadějnou léčbu u nemocí způsobených patologickou reaktivitou B buněk, z výše zmíněných faktů však vyplývá nutnost vždy dobře zvážit čas, zdroj a množství podávaných MSCs v kontextu požadovaného efektu.

2.2.2.3 Regulační B lymfocyty

V posledních letech se ukazuje, že stejně jako u T lymfocytů, makrofágů a DC existuje i u B lymfocytů regulační subpopulace potlačující imunitní reakce označovaná jako regulační B lymfocyty (Breg, regulatory B cells), jejímž hlavním znakem je produkce IL-10 (Ka-Fai Ma and Chan, 2016). MSCs mohou hrát důležitou roli v regulaci vývoje Breg lymfocytů, a to buď přímo – produkcí IL-10 –, nebo zprostředkovaně podporou vývoje a funkce regulačních subpopulací leukocytů, které pak produkují IL-10 (Franquesa *et al.*, 2015, Ka-Fai Ma and Chan, 2016).

Chao *et al.* (2016) na modelu experimentální kolitidy ukázali, že intraperitoneálně aplikované MSCs migrují do zánětlivých ložisek a napomáhají ochraně před negativními dopady tohoto onemocnění, konkrétně především podporou vývoje a aktivace CD5⁺ Breg buněk produkujících IL-10. Breg pak inhibují proliferaci prozánětlivých T lymfocytů a upravují rovnováhu mezi Th1/Th17/Treg. Podobný mechanismus se po aplikaci MSCs může podílet také na zlepšení průběhu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) (Guo *et al.*, 2013a). Indukce CD5⁺ Breg buněk po podání MSCs byla zaznamenána i v klinické studii zabývající se léčbou reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, graft versus

host disease). Kromě samotného nárůstu počtu Breg lymfocytů došlo i k zvýšení sekrece IL-10 těmito buňkami (Peng *et al.*, 2015).

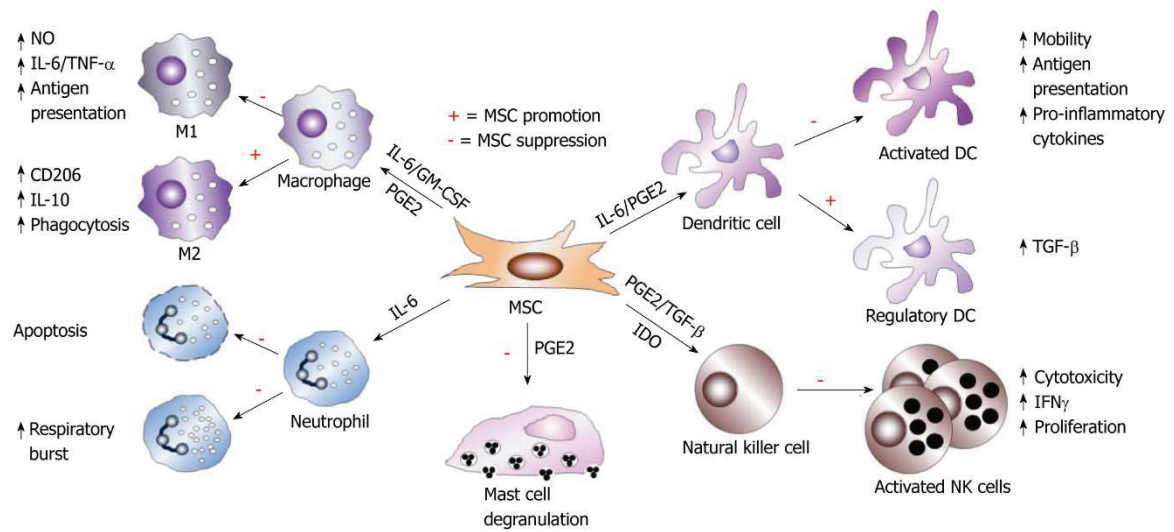
Je důležité zmínit, že v závislosti na cytokinovém mikroprostředí mohou mít MSCs naopak schopnost produkci IL-10 B lymfocyty potlačovat. Tato vlastnost může být společně s ostatními funkcemi MSCs užitečná, pokud je nutné potlačit nežádoucí imunitní odpověď, ale zároveň neutlumit zánětlivou reakci úplně (Hermankova *et al.*, 2016, Holan *et al.*, 2016).

2.2.2.4 Dendritické buňky

Dendritické buňky jsou nejefektivnější APC, které hrají důležitou roli v iniciaci adaptivní imunitní odpovědi. MSCs mají schopnost reverzibilně inhibovat diferenciaci monocytů na DC a indukovat regulační fenotyp charakteristický sníženou expresí molekul CD83 (znak spojený s maturací), redukováným množstvím kostimulačních receptorů CD80, CD86 a molekul nezbytných pro prezentaci antigenů CD1a a MHCII (obr. 3) (Jiang *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2009). Navíc bylo popsáno, že plazmacytoidní DC po kontaktu s MSCs zvýší produkci protizánětlivého cytokinu IL-10, zatímco u myeloidních DC se sníží sekrece prozánětlivého TNF- α (Aggarwal and Pittenger, 2005). Zároveň se u DC mění i schopnost zpracovat a prezentovat antigen, a to nejen na MHCII, ale i MHCI, čímž je přímo ovlivněna regulace a aktivace CD4 i CD8 T lymfocytů (Chiesa *et al.*, 2011). MSCs regulují DC prostřednictvím sekrečních faktorů, jako jsou IL-6, CCL2, IL-10 nebo PGE-2, přímým mezibuněčným kontaktem a dále také nepřímou prostřednictvím T lymfocytů (Aggarwal and Pittenger, 2005, Liu *et al.*, 2013, Park *et al.*, 2015)

Vlivem MSCs se snižuje sekrece chemokinu CCL5 T lymfocyty, což vede ke sníženému kontaktu mezi T buňkami a DC a tím ke snížení stimulace imunitní odpovědi DC (Park *et al.*, 2015). Kromě toho se inhibuje i produkce faktoru stimulujícího kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) T lymfocyty, což je cytokin podporující diferenciaci DC. Jiang *et al.* (2005) ukázali, že po společné kultivaci s MSCs mají DC schopnost snižovat produkci IFN- γ T lymfocyty, a naopak podporovat sekreci IL-10. V přítomnosti MSCs se také snižuje produkce IL-12 DC. To bylo potvrzeno i v *in vivo* studii, kde se vlivem MSCs snižovala exprese receptorů CCR7 a CD49d β 1 na DC a tím jejich schopnost migrovat do lymfatických orgánů a aktivovat antigen-specifické naivní T lymfocyty (Chiesa *et al.*, 2011). Dále se ukázalo, že MSCs dokážou efektivně indukovat nematurovaný fenotyp u DC izolovaných z pacientů trpících diabetem typu 1. Spolu s tím se snižoval počet Th17 lymfocytů, a naopak

zvýšovalo procento Treg buněk. Ke stejnému efektu dochází i při použití extracelulárních váčků derivovaných z MSCs (Favaro *et al.*, 2016).



Obrázek 3. Působení MSCs na buňky vrozené imunity. Leukocyty účastníci se vrozené imunitní odpovědi ovlivňují MSCs především rozpustnými faktory, jako jsou IL-6, GM-CSF, PGE2, TGF- β a aktivita IDO. MSCs mají schopnost inhibovat funkce prozánětlivých subpopulací DC a M1, a naopak podporovat diferenciaci a aktivitu regulačních M2 buněk a DC. U NK buněk se působením MSCs snižuje cytotoxicita, produkce IFN- γ a proliferace, v případě žírných buněk se snižuje migrace a degranulace. MSCs mají vliv i na neutrofile, u kterých snižují apoptózu a respirační vzplanutí. (převzato a upraveno z Glenn and Whartenby, 2014).

2.2.2.5 Makrofágy

Makrofágy jsou klíčovou součástí přirozené imunity a hrají důležitou roli v iniciaci i průběhu zánětu a také v následné regeneraci tkáně. MSCs mají schopnost výrazně ovlivňovat regulaci zánětu makrofágy, především díky své schopnosti potlačovat funkce M1 subpopulace charakteristické produkcí NO, prozánětlivých cytokinů a prezentací antigenů T buňkám a současně schopnosti podporovat diferenciaci alternativně aktivovaných M2 makrofágů s regulačním protizánětlivým fenotypem (obr. 3) (Glenn and Whartenby, 2014). Prostřednictvím PGE2 potlačují MSCs produkci TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , CCL-2 a expresi iNOS, a naopak podporují sekreci IL-10 a IL-4 makrofágy. Zároveň se u makrofágů indukuje exprese povrchového znaku CD206 a enzymu arginázy 1 (Arg1) (Kim and Hematti, 2009, Maggini *et al.*, 2010, Cho *et al.*, 2014). MSCs také podporují schopnost fagocytózy M2 makrofágy, ale zároveň potlačují jejich aktivační potenciál snížením exprese CD86 a MHCII (Kim and Hematti, 2009). Po kultivaci MSCs

s naivními makrofágy dochází k diferenciaci na M1 fenotyp se zvýšenou mikrobicidní a prozánětlivou funkcí (ale zároveň neaktivují u těchto makrofágů funkce APC), což může být užitečné zejména při začátku infekce; zatímco kultivace s už diferencovanými M1 makrofágy vede k silnému potlačení funkce těchto buněk a indukci protizánětlivého M2 fenotypu (Vasandan *et al.*, 2016).

Na modelu transplantace průdušnice bylo popsáno, že aplikace MSCs vede prostřednictvím produkce PGE-2 ke zvýšené produkci IL-10, a naopak redukcí sekrece IL-6 a TNF- α makrofágy a tím snížení zánětlivé odpovědi (Guo *et al.*, 2013b). Dále bylo zjištěno, že při transplantaci srdce dochází po podání MSCs ke zvýšení exprese Arg1 v makrofázích infiltrujících do myokardu (Cho *et al.*, 2014). Na snížení prozánětlivých funkcí makrofágů se podílí také TSG-6 sekretovaný aktivovanými MSCs (Choi *et al.*, 2011).

2.2.2.6 NK buňky

NK buňky se někdy označují jako další populace lymfocytů a představují hlavní efektorové buňky vrozené imunity. Ukázalo se, že MSCs mají schopnost efektivně potlačovat proliferaci klidových NK buněk, na aktivované NK buňky mají mnohem menší vliv (Rasmusson *et al.*, 2003, Spaggiari *et al.*, 2006). Inhibiční efekt MSCs je zprostředkován předevšímIDO a PGE2 a projevuje se kromě snížené proliferace a produkce cytokinů snížením exprese povrchových aktivačních receptorů NK buněk a s tím spojenou inhibicí cytotoxické aktivity (obr. 3) (Spaggiari *et al.*, 2008).

Zajímavým zjištěním je, že MSCs mají zřejmě schopnost produkci IFN- γ NK buňkami i zvyšovat. Spaggiari *et al.* (2006) ukázali, že tento potenciál mají především neaktivované MSCs. K nárůstu produkce IFN- γ může dojít i pomocí pozitivní zpětnovazebné smyčky. Minoritní subpopulace CD56^{bright} NK buněk produkcí IFN- γ zvyšuje sekreci CCL2 MSCs a tento chemokin pak podporuje expresi IFN- γ CD56^{bright} NK. Důležitým poznatkem pak je, že tato aktivace probíhá i u buněk izolovaných z imunokompromitovaných pacientů, což otevírá možnost použití MSCs i v případech, kdy je zánětlivá imunitní odpověď nedostatečná (Cui *et al.*, 2016).

2.2.2.7 Neutrofily

Neutrofily představují první obrannou linii proti patogenům, účastní se akutního zánětu a jejich hlavní funkcí je fagocytóza. Jejich patologická aktivace však může být destruktivní

pro tkáň v jejích okolí. Bylo popsáno, že MSCs mají schopnost potlačovat apoptózu jak klidových buněk, tak neutrofilů aktivovaných IL-8 a inhibovat oxidační vzplanutí. Jejich efekt přitom není závislý na přímém buněčném kontaktu, ale na sekreci IL-6. Efektivně tak potlačují rozvinutí zánětlivé reakce, nebrání ale fagocytóze a migraci (obr. 3) (Raffaghello *et al.*, 2008). Nejnovější poznatky ukazují, že MSCs v prostředí aktivních neutrofilů produkují enzym superoxid dismutázu 3 (SOD3), jejímž hlavním přínosem je ochrana tkání před reaktivními kyslíkovými radikály. Zároveň bylo pozorováno, že MSCs mají schopnost v omezené míře pohlcovat apoptické neutrofile a tím bránit vylití toxických granul (Jiang *et al.*, 2016).

Unikátní výsledky předložili Brandau *et al.* (2014), kteří pozorovali, že MSCs se dokážou v případě infekce podílet na vzniku a regulaci lokálního zánětu prostřednictvím produkce IL-6, IL-8 a inhibičního faktoru migrace makrofágů (MIF, macrophage migration inhibitory factor), čímž atrahují neutrofile a aktivují jejich fagocytické funkce.

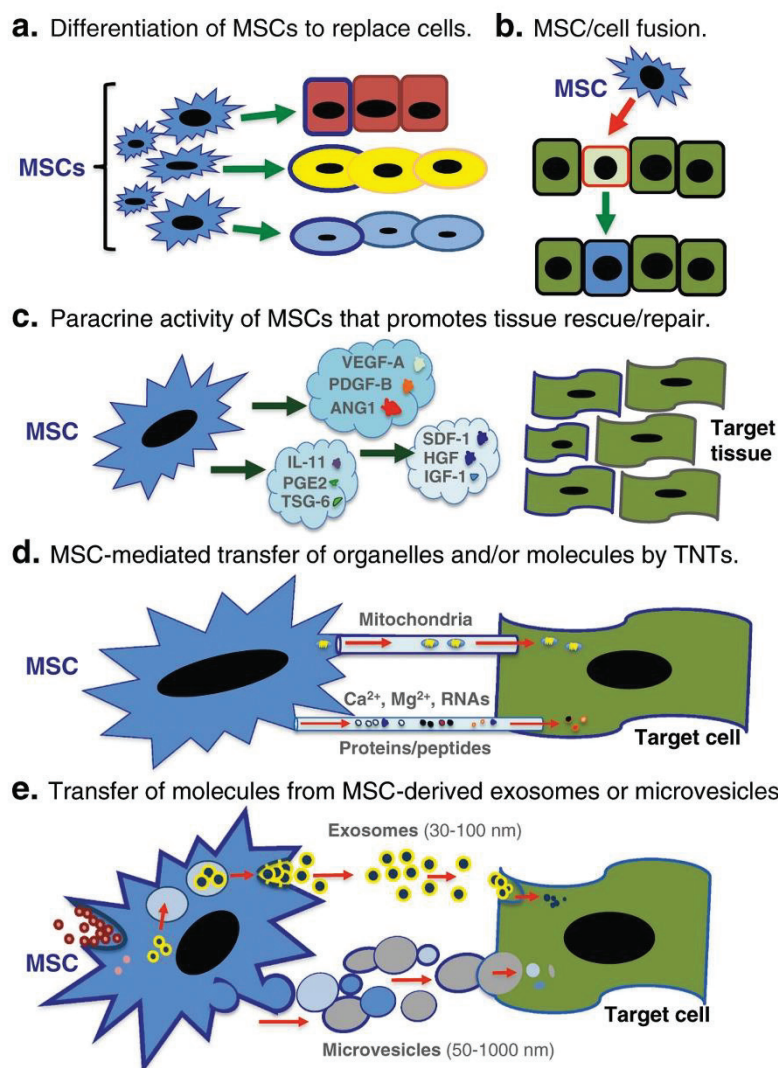
2.2.2.8 Žírné buňky

Hlavní funkcí žírných buněk je sekrece prozánětlivých cytokinů a granul obsahujících mimo jiné heparin či histamin. Uplatňují se při zánětlivých procesech, ale také při vzniku alergických reakcí a některých autoimunitních onemocnění. Bylo prokázáno, že MSCs prostřednictvím PGE-2 potlačují produkci cytokinů – zejména TNF- α , migraci a degranulaci žírných buněk, a to jak v *in vitro* kulturách tak v *in vivo* modelu (obr. 3) (Brown *et al.*, 2011). Dalším faktorem produkovaným MSCs, který se podílí na potlačování funkcí žírných buněk, je TGF- β 1 (Kim *et al.*, 2015a).

2.2.3 Cytoprotektivní, antiapoptotické a trofické vlastnosti MSCs

Kromě ovlivňování jednotlivých komponent imunitního systému mají MSCs i další terapeuticky výhodné vlastnosti. Jak již bylo zmíněno, tyto buňky disponují schopností diferencovat i transdiferencovat a tím nahrazovat poškozené tkáň (obr. 4). Pomocí MSCs značených zeleným fluorescenčním proteinem (GFP, green fluorescent protein) bylo například zjištěno, že po intradermální aplikaci mohou na základě potenciálu diferencovat v keratinocyty, endoteliální buňky a pericyty napomáhat reepitelizaci a hojení kožního poranění (Wu *et al.*, 2007, Sasaki *et al.*, 2008). Kromě toho sekrecí cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor) a angiopoietinu-1 napomáhají angiogenezi (Wu *et al.*, 2007). MSCs jsou schopné produkovat řadu dalších trofických faktorů, mezi které patří například GM-CSF, fibroblastový růstový faktor,

erythropoietin, faktor kmenových buněk, chemokiny, leukemický inhibiční faktor, nervový růstový faktor nebo růstový faktor krevních destiček (obr. 4). Produkci metaloproteináz a inhibitorů metaloproteináz mohou MSCs remodelovat extracelulární matrix (Doorn *et al.*, 2012, Hofer and Tuan, 2016).



Obrázek 4. Mechanismy antiapoptotického, cytoprotektivního a regenerativního působení MSCs. (a) Poškozenou tkáň mohou MSCs regenerovat nahrazením nefunkčních buněk diferenciací (b) nebo přímo splynout s poškozenými buňkami. (c) MSCs také mohou působit parakrinně pomocí cytokinů, růstových faktorů a dalších molekul jako je PGE2 a TSG-6. Mezi nejnověji objevené způsoby ovlivnění cílových buněk patří (d) tvorba TNTs prostřednictvím kterých se mohou transportovat ionty, proteiny ale i mitochondrie (e) a dále produkce extracelulárních váčků nesoucích proteiny, RNA, hormony a další molekuly (převzato a upraveno ze Spees *et al.*, 2016)

Dalším terapeutickým přínosem MSCs je ochrana tkání před oxidativním poškozením tím, že zvyšují množství a aktivitu SOD a glutathionu (Yang *et al.*, 2015, Jiang *et al.*, 2016) a dále protekce nepoškozených i imunitních buněk před apoptózou (Gu *et al.*, 2013, Normanton *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2015). Díky výše zmíněným schopnostem dokážou MSCs velmi efektivně zabránit fibróze tkání a napomáhat tak regeneraci poškozené oblasti (Spees *et al.*, 2016).

Poměrně nedávno objeveným mechanismem působení MSCs je sekrece extracelulárních váčků. Jedná se o exosomy o velikosti 30–100 nm a mikrovesikuly velké 50–1000 nm, které mohou obsahovat jak výše zmíněné trofické faktory, cytokiny, miRNA a další rozpustné molekuly, tak membránově vázané receptory (obr. 4) (Merino-Gonzalez *et al.*, 2016, Spees *et al.*, 2016). Bylo ukázáno, že stejně jako MSCs samotné se mohou podílet na imunomodulačních dějích i na ochraně a reparaci tkáně. Mezi výhody extracelulárních váčků patří schopnost ochránit přenášené faktory před rychlou degradací a tím zvýšit jejich dosah; také na rozdíl od MSCs nepodléhají rejekci a nezpůsobují embolie (Yang *et al.*, 2015, Favaro *et al.*, 2016)

Jedním z nejnověji objevených mechanismů působení jsou tzv. „tunneling nanotubes (TNTs)“. Tyto trubičky tenké 50–200 nm slouží k mezibuněčnému kontaktu a je možné přes ně přenášet ionty, nukleové kyseliny, a dokonce i organely (obr. 4) (Spees *et al.*, 2016). Liu *et al.* (2014) pozorovali, že pomocí TNTs mohou být přenášeny mitochondrie z MSCs do poškozených epitelových buněk, což vede k inhibici apoptózy a regeneraci tkáně.

2.3 Terapeutické využití MSCs

Široké spektrum účinků předurčuje MSCs pro výzkum a jejich možnou aplikaci v klinické praxi. Prvotní zájem o využití těchto buněk vzbudily především jejich diferenciační schopnosti. Obrovský potenciál se ale skrývá také v možnosti regulovat pomocí aplikace MSCs rovnováhu mezi jednotlivými populacemi T a B lymfocytů a ve schopnosti podporovat regulační subpopulace všech leukocytů a tím směřovat imunitní odpověď v protizánětlivou, tolerantní. Využití imunomodulačních vlastností je zkoumáno na zvířecích modelech při léčbě alergických onemocnění (Goodwin *et al.*, 2011, Kavanagh and Mahon, 2011) a autoimunitních onemocnění, jako jsou roztroušená skleróza (Zappia *et al.*, 2005, Rafei *et al.*, 2009) nebo SLE (Zhou *et al.*, 2008a, Chang *et al.*, 2011). Terapeutická aplikace MSCs se jeví jako výhodná i při potlačení GVHD (Kim *et al.*,

2015b), při snížení imunitní odpovědi po transplantaci (Bartholomew *et al.*, 2002, Popp *et al.*, 2008, Sbano *et al.*, 2008) nebo při léčbě poškození povrchu oka (Zajicova *et al.*, 2010, Roddy *et al.*, 2011, Cejka *et al.*, 2016b).

Pilotní a případové studie demonstrovaly podobný léčebný potenciál i u lidí. Podání MSCs významně podporuje úspěšnost a terapeutický efekt transplantace HSCs (Koc *et al.*, 2000) a stimuluje růst u dětí trpících závažným onemocněním osteogenesis imperfecta (Horwitz *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že alogenní MSCs je možné využít pro potlačení chronické i akutní GVHD (Le Blanc *et al.*, 2004b, Peng *et al.*, 2015) nebo při léčbě roztroušené sklerózy (Liang *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2014a). Dále bylo ověřeno, že autologní MSCs jsou bezpečnou a realizovatelnou terapií při transplantaci ledvin (Perico *et al.*, 2011) a v kombinaci s nízkou imunosupresí mohou podporovat vznik Treg, potlačovat proliferaci T lymfocytů a zabránit rejekci ledviny (Peng *et al.*, 2013, Mudrabetu *et al.*, 2015). Na základě slibných výsledků těchto a dalších prací lze říci, že MSCs představují velice atraktivní terapeutickou možnost pro klinické využití. To potvrzuje i počet klinických studií, který v posledních letech dramaticky stoupá. V roce 2016 bylo v databázi klinických studií (<https://clinicaltrials.gov/>) registrováno přes 500 studií (Wang *et al.*, 2016). Dnes je to téměř 700 ve všech fázích klinického výzkumu, z toho naprostá většina se nachází ve fázích I., I/II a II. Ve studiích, které zatím prošly až do třetí fáze (cca 6 %), se využívají autologní i alogenní MSCs izolované převážně z kostní dřeně. Dalšími zdroji jsou pak pupečnicková krev a tuková tkáň. Mezi nejčastější použití patří léčba akutního infarktu myokardu, GVHD, diabetu, Cronovy choroby, poranění páteře a osteoartritida (<https://clinicaltrials.gov/>).

Na tomto místě je nezbytné zmínit, že s léčbou využívající MSCs jsou spojené obavy vycházející z rizika vzniku nebo podpory růstu nádorů. Bylo popsáno, že dlouhodobá kultivace MSCs může mít za následek vznik genomových mutací. Zdá se však, že nepodléhají maligní transformaci (Wang *et al.*, 2013). Díky svým migračním a imunomodulačním vlastnostem ale MSCs samotné představují jak naději pro terapii, tak hrozbu zhoršení nádorových onemocnění. Waterman *et al.* (2012) ukázali, že v závislosti na mikroprostředí a následné polarizaci mají MSCs potenciál potlačovat migrační schopnosti nádorových buněk a růst nádorů, nebo naopak podporovat rozvoj a vznik metastáz. Velkou nadějí ale mohou být MSCs preinkubované s léčivou (Pessina *et al.*, 2015) nebo geneticky manipulované MSCs, které by mohly sloužit jako nosič pro léčiva, cytokiny nebo enzymy zaručující lokální přeměnu neškodné látky na farmakologicky

aktivní molekulu především v nádorové tkáni (Pessina *et al.*, 2015, Nowakowski *et al.*, 2016).

2.3.1 Možnosti aplikace MSCs a jejich migrace

Jednou z velice atraktivních vlastností pro využití MSCs v klinické praxi je jejich schopnost migrovat do místa poranění nebo zánětu a potenciál regulovat imunitní odpověď i na delší vzdálenosti. Z dosavadních výsledků se zdá, že mechanismy, které MSCs využívají k usídlení, úspěšnost aplikace a délka přežití závisí na mnoha faktorech, jako jsou způsob a čas podání, množství a stav MSCs před aplikací a v neposlední řadě také stav organismu příjemce. Z toho plyne, že v závislosti na požadovaném účinku terapie je nezbytné precizně definovat a zvážit vliv výše zmíněných proměnných na MSCs (De Becker and Riet, 2016, Leibacher and Henschler, 2016).

2.3.1.1 Systémová aplikace MSCs

Při podání MSCs do krevního řečiště se využívá vlastnost MSCs odpovídat na prozánětlivé faktory a jejich schopnost prostoupit do zánětlivé tkáně. Pro migraci skrze cévní epitel využívají MSCs molekul P-selektinu a cévní adhezivní molekulu (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) na endotelových buňkách, který se váže ke svému receptoru, pozdnímu aktivačnímu antigenu-4 (VLA-4, very late activation molecule) na MSCs (Ruster *et al.*, 2006). Pro cílení MSCs jsou dále důležité chemokinové receptory, jako jsou CCR6, CCR9, CXCR4 a CXCR6 (Chamberlain *et al.*, 2008).

Často využívaným způsobem podání je intravenózní aplikace. Bylo zjištěno, že takto podané MSCs mají schopnost se usídlit v kostní dřeni pacientů postižených genetickou poruchou osteogenesis imperfekta, kde pomáhají podpořit růst a tvorbu kostní tkáně (Horwitz *et al.*, 2002). Pomocí radioaktivního značení MSCs bylo pozorováno, že bezprostředně po aplikaci se MSCs hromadí v plicích, po několika hodinách ale může docházet k redistribuci do dalších orgánů, jako jsou játra nebo slezina (Gholamrezanezhad *et al.*, 2011). Dále bylo popsáno, že MSCs značené GFP je po infuzi možné detekovat v thymu, gastrointestinálních tkáních, ledvinách, kůži (Devine *et al.*, 2003) či mozku (Zappia *et al.*, 2005). Nicméně intravenózní aplikace s sebou vzhledem k poměrně velkému rozměru MSCs nese riziko vzniku plicní embolie, a navíc se velká část buněk může zachytit v plicích a vůbec se nedostane přímo do místa zánětu (Makela *et al.*, 2015, Leibacher and Henschler, 2016). Tomu lze částečně předcházet podáním vazodilatačních přípravků před nebo současně s aplikací MSCs (De Becker and Riet, 2016). Důležitým

poznatkem je, že i buňky zachycené v plicích se mohou prostřednictvím sekrece solubilních terapeutických faktorů podílet na potlačení zánětu. Na myším modelu infarktu myokardu bylo zjištěno, že po aplikaci MSCs dochází ke snížení zánětlivé odpovědi a redukcii postižení. Přitom jen minimální množství MSCs migrovalo do srdeční tkáně, většina buněk byla detekována v plicích (Lee *et al.*, 2009).

Vhodnou alternativu představuje intraarteriální aplikace MSCs. Tento přístup umožňuje redukovat množství buněk zachycených v plicích, a naopak zvýšit jejich distribuci do jater, sleziny a ledvin (Makela *et al.*, 2015). Intraarteriální aplikace je ovšem invazivnější než intravenózní podání (De Becker and Riet, 2016), a navíc i zde může docházet ke komplikacím spojeným s ucpáváním mikrovaskulatury (Furlani *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Lokální aplikace

Nejspolehlivějším způsobem, jak zajistit, že se většina aplikovaných buněk dostane přímo do léčeného místa, je lokální podání MSCs. Zároveň je tak možné předejít vzniku plicní embolie. Bylo ověřeno, že MSCs je možné bezpečně injikovat přímo do kloubu (Toupet *et al.*, 2013), oka (Yao *et al.*, 2012), indradermálně do místa kožního poranění (Wu *et al.*, 2007) nebo přímo do blízkosti tkáně postižené infarktem (Cho *et al.*, 2014). Pro léčbu gastrointestinálních onemocnění se jako vhodná varianta jeví i intraperitoneální podání (Chao *et al.*, 2016). I s lokální aplikací se však spojují určité nevýhody. Při injekci buněk do tkáně může dojít k poškození tkáně jehlou, k vytvoření tlaku v bezprostřední blízkosti aplikace, případně drobnému poranění a krvácení, což může mít za následek rozvoj zánětlivé imunitní odpovědi (Nowakowski *et al.*, 2015).

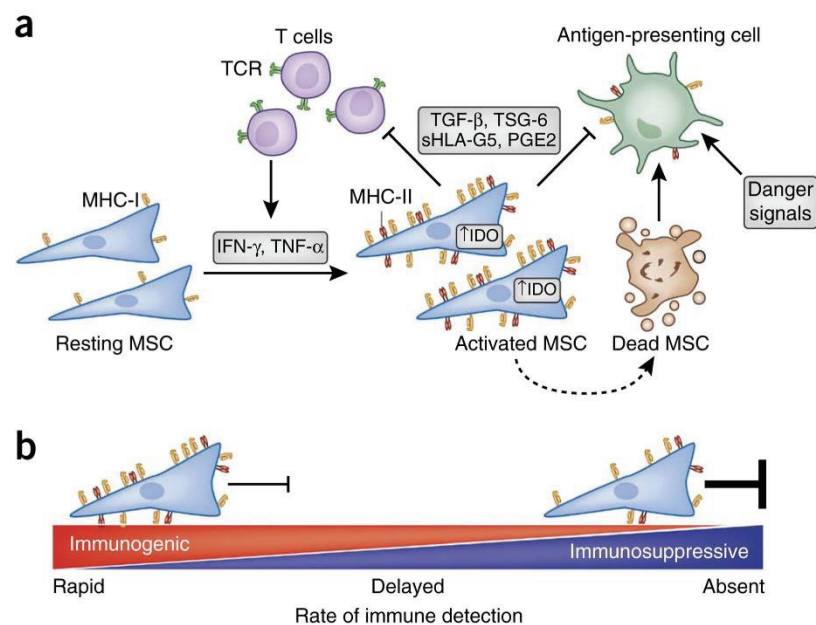
Kromě injekce přímo do léčeného místa lze pro lokální aplikaci využít i různé nosiče, jako jsou amniová membrána (Kim *et al.*, 2009, Jiang *et al.*, 2010) nebo nanovláknenné nosiče (Zajicova *et al.*, 2010, Cejka *et al.*, 2016a) (viz kap. 2.3.4).

2.3.2 Přežívání a imunogenicita aplikovaných MSCs

Další důležitou informací je, jak dlouho dokážou alogenní MSCs v cílovém místě přežít. Ukazuje se, že průměrná doba se pohybuje v rozmezí dnů (Leibacher and Henschler, 2016). Toupet *et al.* (2013) byli schopni ještě měsíc po lokální aplikaci MSCs detekovat 15 % transplantovaných buněk v léčené tkáni a prokázali i dlouhodobé – šestiměsíční – přežívání. Devine *et al.* (2003) dokonce pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR, polymerase chain reaction) detekovali sekvenci značených MSCs 21 měsíců od infuze. Bylo také prokázáno, že alogenní MSCs jsou schopné po transplantaci přežít až dvakrát

déle než alogenní fibroblasty (Zangi *et al.*, 2009). Mechanismus, díky kterému alogenní MSCs dlouhodobě přežívají v organismu, však pravděpodobně není podložen přímo imunoprivilegovaností, ale spíše schopností v závislosti na mikroprostředí na určitou dobu potlačit rejekční mechanismy a uniknout tak imunitnímu systému (Ankrum and Karp, 2010).

MSCs kultivované v *in vivo* podmínkách se vyznačují nízkou expresí MHCI a absencí MHCII a kostimulačních receptorů CD80/CD86 nebo CD40. Tento hypoimmunogenní fenotyp se ale může vlivem zánětlivé reakce – zejména přítomností IFN- γ – změnit (obr. 5) (Stagg *et al.*, 2006, Romieu-Mourez *et al.*, 2007). Zvýšení exprese MHC může mít dvojitý účinek. MSCs na svém povrchu exprimují ligandy pro aktivační receptory NK buněk, přítomnost MHCI je tedy chrání před lýzou (Spaggiari *et al.*, 2006). Pokud se ale nejedná o autologní MSCs, mohou pak být buňky terčem pro Tc a aktivovat imunitní odpověď. V *in vivo* studii na primátech bylo prokázáno, že alogenní MSCs mohou být slabě imunogenní, zejména pokud není brán ohled na MHC kompatibilitu (Isakova *et al.*, 2014). Mezi další možné mechanismy potlačení rejekce MSCs se řadí exprese Fas-L MSCs (Akiyama *et al.*, 2012) nebo inhibice aktivace komplementu (Tu *et al.*, 2010).



Obr. 5. Rovnováha mezi imunogenním a hypoimmunogenním stavem MSCs. (a) Klidové MSCs jsou hypoimmunogenní – exprimují jen velmi malé množství MHCI a žádné MHCII. Po aktivaci IFN- γ a TNF- α se ale exprese obou těchto komplexů zvýší. Zároveň s tím se ale také indukují protizánětlivé schopnosti MSCs, což buňkám umožní bránit se rejekci. MSCs, které nejsou schopné se ubránit detekci imunitním systémem,

podléhají apoptóze. (b) Schopnost alogenních MSCs efektivně vyvážit imunogenní a imunosupresivní molekuly je tedy klíčová pro jejich přežívání a efektivnost transplantace. (Převzato a upraveno z Ankrum et al., 2015).

2.3.3 Faktory, které mohou ovlivnit úspěšnost aplikace

Kromě způsobu aplikace může úspěšnost terapie využívající MSCs ovlivnit řada dalších podmínek. Důležité je optimalizovat množství použitých buněk. Podání velkého množství MSCs může představovat vysoké riziko vzniku embolie a rychlejší přerušování krevní mikrocirkulace (Furlani *et al.*, 2009). Aplikace velkého počtu buněk však nemusí být pro dosažení cíleného efektu nezbytné. Bylo prokázáno, že i malé množství MSCs může mít terapeutický vliv (Horwitz *et al.*, 2002, Girdlestone, 2016). Hlavním mechanismem působení MSCs však pravděpodobně není diferenciací a náhrada poškozené tkáně, ale spíše produkce parakrinních faktorů (Hofer and Tuan, 2016).

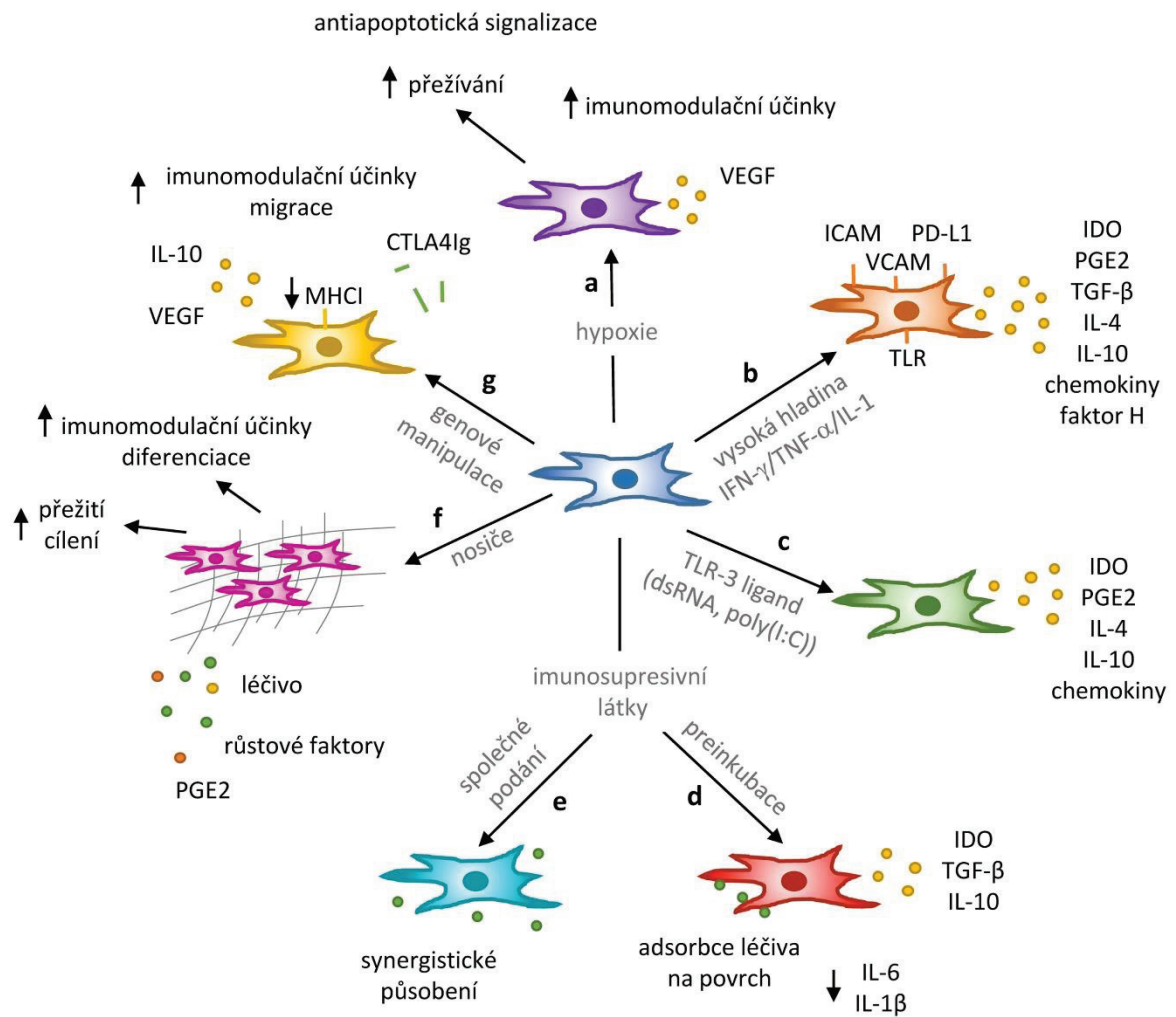
Ukázalo se, že zásadní roli při terapii využívající MSCs může hrát také načasování. Jako nejvýhodnější se jeví velmi časná aplikace. Pokud se MSCs přidají do kultury hned na začátku, dochází k inhibici všech CD4⁺ T lymfocytů, zatímco přidání až třetí den vede jen k částečnému potlačení produkce IFN- γ , a navíc může dojít dokonce k nárůstu produkce IL-17 (Carrion *et al.*, 2011). K podobným závěrům došla studie testující aplikaci MSCs v různých stádiích průběhu experimentální autoimunitní encefalitidy (EAE), kde bylo zjištěno, že pouze časné podání MSCs vede ke zmírnění klinických projevů tohoto onemocnění (Luz-Crawford *et al.*, 2013). Jedním z důležitých faktorů, které hrají roli v terapeutickém účinku MSCs, je kolísání hladiny IFN- γ během progresu onemocnění. Proto, aby byly MSCs efektivně aktivovány a měly co nejvyšší imunosupresivní účinky, je vhodné je aplikovat ve chvíli, kdy jsou koncentrace tohoto cytokinu v organismu nejvyšší (Polchert *et al.*, 2008).

Neméně důležitou otázkou je, zda použít autologní nebo alogenní buňky. Vzhledem k výše popsané možné imunogenicitě MSCs a možnosti, že se jejich vlivem dokonce zhorší průběh léčby (Sbano *et al.*, 2008, Isakova *et al.*, 2014), se jako nejbezpečnější jeví aplikace autologních buněk. V případech, kdy je nutné zahájit terapii co nejrychleji, nebo je potřeba velké množství buněk v opakovaných dávkách, může však být nutné použít jiného dárce. Kontraindikací pro izolaci a použití autologních MSCs mohou být také některá onemocnění nebo pokročilý věk (Nie *et al.*, 2010, Hare *et al.*, 2012, Alagesan and Griffin, 2014, Zhang *et al.*, 2015). Z hlediska funkcí MSCs se zdá, že mezi autologními a alogenními buňkami není významný rozdíl. Například na modelu kožního poranění u králíků bylo ukázáno, že podání autologních i alogenních MSCs má srovnatelný

terapeutický vliv (Kim *et al.*, 2009). V klinické studii porovnávající vliv autologních a alogenních MSCs injikovaných přímo do srdce na léčbu ischemické kardiomyopatie bylo zjištěno, že oba typy buněk mají regenerativní potenciál a nevyvolávají vznik protilátek (Hare *et al.*, 2012). Pro případy, kdy nelze izolovat autologní buňky a alogenní nejsou dostupné, je velmi nadějně zjištění, že potřebný terapeutický účinek mohou mít i xenogenní buňky (Chang *et al.*, 2011, Payne *et al.*, 2013). Například Chang *et al.*, (2011) ve své studii zjistili, že podání lidských MSCs myším vede k potlačení zánětu v ledvinách spojeným se SLE a změně rovnováhy mezi Th lymfocyty směrem k Th2.

2.3.4 Cílené ovlivňování imunomodulačních schopností MSCs

V současné době je popsáno velké množství mechanismů, které se uplatňují při působení MSCs a rovněž je známo, že jejich schopnosti jsou ve velké míře ovlivňovány mikroprostředím, ve kterém se nacházejí. Je zřejmé, že pokud mají mít tyto buňky požadovaný účinek, je třeba pečlivě vybrat dárce, způsob a načasování aplikace i jejich množství. Kromě toho lze jejich účinky významně podpořit, zesílit, nebo dokonce změnit pomocí ovlivňování podmínek ještě před aplikací, aktivací pomocí prozánětlivých cytokinů nebo ligandů TLR, preinkubací s léčivými, využitím nosičů nebo genetickými manipulacemi (obr. 6).



Obrázek 6. Cílené ovlivňování vlastnosti MSCs. **(a)** Kultivaci MSCs v hypoxických podmínkách se aktivuje antiapoptotická signalizace a přežívání buněk. Dochází také ke zvýšení imunomodulačních účinků a produkci VEGF. **(b)** Působením vysokých hladin prozánětlivých cytokinů nebo **(c)** ligandů TLR se zvyšuje exprese povrchových molekul důležitých pro kontakt MSCs s T lymfocyty (ICAM, VCAM, PD-L1) a chemokinů. Narůstá také produkce nebo aktivita imunomodulačních molekul, jako jsou IDO, PGE2, TGF- β , IL-4, IL-10. **(d)** Preinkubací MSCs s imunosupresivními látkami je možné dosáhnout snížení produkce IL-6 a IL-1 β , a naopak zvýšení aktivity IDO a exprese TGF- β a IL-10. Další výhodou tohoto přístupu je možnost adsorpce léčiva na povrch MSCs a jeho uvolnění v cílovém místě. **(e)** Při společném podání MSCs a imunosupresiv může docházet synergistickému působení na potlačení zánětlivé imunitní odpovědi. **(f)** Zvýšit imunomodulační i diferenciací účinky, úspěšnost aplikace a zlepšit zacílení lze i pomocí nosičů, které mohou navíc uvolňovat lokálně růstové faktory, imunosupresivní látky nebo imunomodulační molekuly, jako je PGE2. **(g)** Prostřednictvím genových manipulací lze podpořit migrační i imunosupresivní účinky MSCs nebo vytvořit buňky produkující přímo léčivo jako je například CTLA4Ig.

2.3.4.1 Aktivace pomocí cytokinů

Jak již bylo zmíněno dříve, působením některých cytokinů se mohou měnit vlastnosti MSCs. Podle některých studií je aktivace pomocí prozánětlivých cytokinů nutná pro indukci imunomodulačních funkcí MSCs (Ren *et al.*, 2008, Krampera, 2011, Franquesa *et al.*, 2015). IFN- γ , TNF- α a IL-1 β podporují aktivituIDO a expresi chemokinových receptorů důležitých pro migraci MSCs (Krampera *et al.*, 2006, Hameda *et al.*, 2010), zvyšují produkci PGE2 a exprese COX-2, PD-L1 (English *et al.*, 2007) a také počet adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 důležitých pro kontakt s T lymfocyty (Ren *et al.*, 2010). Přítomnost IFN- γ v kultuře podporuje expresi HGF a TGF- β (Ryan *et al.*, 2007) a dále se vlivem IFN- γ a TNF- α signifikantně zvyšuje produkce faktoru H MSCs, čímž se tyto buňky významně podílí na inhibici aktivace komplementu (Tu *et al.*, 2010). Pokud dojde v hypoxických podmínkách ke stimulaci MSCs pomocí IFN- γ , IFN- α , TNF- α a IL-1 β , zvýší se exprese TLR a tím citlivost a reaktivita MSCs na další prozánětlivé podněty (Raicevic *et al.*, 2010).

Výhodu preaktivace MSCs pomocí těchto cytokinů se podařilo prokázat i v *in vivo* systémech. MSCs ovlivněné prozánětlivými cytokiny produkují velké množství NO, napomáhají přecházet vzniku GVHD a inhibují přecitlivělost oddáleného typu (Ren *et al.*, 2008). Dále bylo prokázáno, že jsou účinnější při potlačení proliferace leukocytů, efektivněji migrují do zánětlivých ložisek a napomáhají zmírnit zánětlivou odpověď a poškození tkáně při kolitidě (Duijvestein *et al.*, 2011), napomáhají potlačení zánětlivé odpovědi po poranění šlachy a podporují produkci IL-10 (Aktas *et al.*, 2016).

Ovlivnění MSCs pomocí prozánětlivých cytokinů před jejich aplikací tak představuje poměrně atraktivní a jednoduchý způsob pro jejich aktivaci a zlepšení imunomodulačních i migračních schopností. Výhodný je tento přístup obzvláště v případě, že je účinek MSCs třeba výrazně urychlit, nebo pokud existují obavy, že v přirozeném prostředí těla a zánětu není přítomná dostatečně vysoká hladina prozánětlivých cytokinů nezbytných pro jejich aktivaci (Girdlestone, 2016).

2.3.4.2 Působení ligandů TLR

TLR se nachází především na imunitních a epitelových buňkách a jejich úlohou je rozpoznávat konzervované struktury značící přítomnost patogenů v těle. Ukázalo se, že i MSCs exprimují tyto receptory a že po jejich aktivaci mění svoje vlastnosti. Pevsner-Fischer *et al.* (2007) zjistili, že u MSCs se nachází intracelulární i povrchové TLR a že

ligandy těchto receptorů vyvolávají různou odpověď. Aktivace TLR 2, 3 a 4 vede ke zvýšené produkci IL-6 MSCs, aktivace TLR 2 a 4 indukuje translokaci transkripčního faktoru NF- κ B do jádra, inhibuje migraci, a naopak podporuje proliferaci. Zajímavý je v tomto ohledu koncept rozdělovací MSCs na prozánětlivé MSC1 a protizánětlivé MSC2. Po aktivaci TLR4 se spustí prozánětlivé funkce MSCs, zvýší se produkce IL-6, IL-8 a zmenšuje se jejich schopnost potlačit aktivaci T lymfocytů. Oproti tomu aktivací TLR3 se indukuje protizánětlivý fenotyp MSCs schopný potlačit aktivaci T lymfocytů, zvýší se produkceIDO, PGE2, IL-4, IL-10 a chemokinů CCL5 a CCL10 (Waterman *et al.*, 2010).

Dále bylo zjištěno, že v závislosti na nízké hladině IFN- γ , koncentraci buněk a současně přítomnosti ligandů TLR, TGF- β a dalších faktorů může dojít k podpoře schopnosti MSCs prezentovat antigen do takové míry, že se mohou podílet na chemoatrakci leukocytů a tím zvýšení imunitní odpovědi (Stagg *et al.*, 2006, Romieu-Mourez *et al.*, 2007). Zároveň ale bylo prokázáno, že na rozdíl od profesionálních APC neprodukují MSCs IL-12 potřebný pro rozvoj Th1 odpovědi (Romieu-Mourez *et al.*, 2009) a že v průběhu imunitní odpovědi se následkem vysoké koncentrace IFN- γ schopnost exprimovat MHCII a prezentovat antigeny významně snižuje (Chan *et al.*, 2006).

2.3.4.3 Zlepšení přežívání aplikovaných MSCs

Jedním z problémů, kterým čelí terapie využívající MSCs, je jejich poměrně velká úmrtnost v ischemické tkáni. Vhodnou strategií by mohlo být buňky před podáním kultivovat v takových podmínkách, kterým budou vystaveny v poškozené tkáni (Saparov *et al.*, 2016). Výhodné se v tomto směru jeví působení hypoxie. Bylo prokázáno, že kultivováním MSCs v hypoxických podmínkách dochází k aktivaci antiapoptické signalizace a tím podpoře jejich přežívání a navíc se zvyšují angiogenní schopnosti těchto buněk (Bader *et al.*, 2015). Takto ovlivněné buňky produkují více VEGF, TGF- β a lépe tak podporují hojení kožního poranění (Jun *et al.*, 2014). Navíc se ukazuje, že hypoxické podmínky neinterferují s imunomodulačními schopnostmi MSCs, naopak dochází ke zvýšení schopnosti potlačit proliferaci lymfocytů (Roemeling-van Rhijn *et al.*, 2013). Prodloužit dobu přežití, a tedy aktivitu MSCs v organismu lze i pomocí použití enkapsulace buněk, například pomocí alginátu; tato metoda podporuje jejich viabilitu i imunomodulační vlastnosti, umožňuje kontrolovaně doručit buňky do zánětlivého místa a podílet se na regeneraci tkáně (Barminko *et al.*, 2011).

2.3.4.4 Využití imunosupresivních látek

Terapeutické protokoly využívající MSCs při léčbě řady autoimunitních chorob nebo transplantací často vyžadují také imunosupresi (Liang *et al.*, 2009, Peng *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2014a). Účelem léků je sice primárně potlačit proliferaci nebo funkce lymfocytů, jejich receptory však exprimují i MSCs. Lze tedy předpokládat, že imunosupresivní látky ovlivní i vlastnosti MSCs. Chen *et al.* (2008) ukázali, že preinkubace MSCs s cyklosporinem A (CsA) zabraňuje apoptóze způsobené hypoxií. Dále bylo zjištěno, že vlivem glukokortikoidů se zvyšuje exprese a aktivitaIDO v MSCs (Ankrum *et al.*, 2014). Rapamycin (Rapa) u MSCs zvyšuje expresi IL-10, IDO, TGF- β a chemokinových receptorů a zároveň snižuje expresi IL-6 a IL-1 β . Tyto změny jsou spojeny s autofágií a změnou migrace MSCs. Výsledky studie ověřili autoři i v *in vivo* modelu GVHD kde zjistili, že MSCs preinkubované s Rapa snižují klinickou závažnost onemocnění prostřednictvím potlačení Th1/Th17, a naopak podpory Th2/Treg populace lymfocytů (Kim *et al.*, 2015b).

Studie zabývající se srovnáním vlivu preinkubace MSCs s Rapa, CsA, FK506 a everolimu prokázala, že dalším mechanismem podpory účinků MSCs imunosupresivními látkami může být jejich adsorpce na povrch buněk. Už krátká preinkubace vedla k přichycení množství dostatečného pro potlačení proliferace T lymfocytů. Díky imunosupresivním vlastnostem MSCs a jejich schopnosti migrace by se tak mohlo jednat o atraktivní terapii cílící účinky imunosupresiv pouze do místa zánětu (Girdlestone *et al.*, 2015).

Neméně důležité je zjištění, že mezi MSCs a imunosupresivy může docházet k potenciaci. Rapa, CsA a takrolimus (Tac, tacrolimus) podané společně s MSCs ve směsné lymfocytární reakci mají antagonistický vliv na účinky MSCs, dexamethazon (Dex) je neovlivňuje a mykofenolát mofetil (MMF) naopak podporuje efekt MSCs (Buron *et al.*, 2009). Hoogduijn *et al.* (2008) nepozorovali žádný vliv MSCs na funkci MMF, ale zjistili, že Tac a Rapa zvyšují imunosupresivní účinky MSCs. Aplikace CsA může zamezit urychlení odhojení transplantátu způsobenému přítomností alogenních MSCs (Sbano *et al.*, 2008). MSCs podané společně s MMF nebo RAPA mají synergistický vliv na potlačení zánětlivé odpovědi po transplantaci srdce, sirolimus a CsA podobný efekt neměly (Eggenhofer *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2014).

Všechny zmíněné studie ukazují, že výzkum zabývající se společným podáváním MSCs a imunosupresivních látek je aktuální a perspektivní. Mimo jiné tato kombinovaná

léčba představuje velkou naději pro snížení dávek a tím dopadu vedlejších účinků těchto léků na organismus. Výsledky však zatím nejsou příliš jednotné a nebylo spolehlivě definováno, jaké mechanismy se při těchto dějích uplatňují.

2.3.4.5 Využití nosičů

Terapeutický účinek MSCs lze významně zlepšit také jejich zacílením. Toho je možné dosáhnout buď injekcí přímo do léčené tkáně, nebo s využitím nosičů. Ty představují výhodnou volbu především proto, že už samy o sobě mohou chránit zánětlivé místo a napomáhat regeneraci tkáně. Bylo zjištěno, že nanovláknina zabraňuje prostupu vzduchu a vody ke kožnímu poranění, napomáhají reepitelizaci a migraci keratinocytů (Dubsky *et al.*, 2012). Na nanovlákniněch je možné MSCs kultivovat, což významně usnadňuje jejich přenos. Zajicova *et al.* (2010) ukázali, že pomocí nanovláknenných nosičů lze aplikovat MSCs nebo limbální kmenové buňky na poraněný povrch oka a tím potlačit zánětlivé procesy. Navíc lze pomocí modifikace struktury a složení nosičů modulovat i vlastnosti MSCs. V závislosti na složení nosiče se může měnit exprese MHC I i II molekul MSCs. Jako nejvýhodnější se z tohoto hlediska jevil hydrogel, na kterém vykazovaly MSCs nejnižší expresi těchto molekul a který navíc zajišťoval optimální 3D strukturu pro ochranu, růst a fungování buněk (Yuan *et al.*, 2011). Nanovláknenné nosiče složené z kolagenu, kyseliny mléčné a kaprolaktonu mají schopnost napodobit strukturu extracelulární matrix kůže, vytvořit vhodné niky pro buňky a podpořit tak diferenciaci MSCs v epidermální buňky (Jin *et al.*, 2011).

Výhodou nosičů je také to, že je možné do nich enkapsulovat různé látky, jako jsou antibiotika, růstové faktory, plazmidovou DNA, vitamíny, imunosupresiva i chemoterapeutika (Chew *et al.*, 2006). Tímto způsobem je možné léky zacílit a významně zmenšit dávky a tím i vedlejší účinky terapeutik. Například CsA inkorporovaný do nanovláknenných nosičů z mléčné kyseliny neztrácí svou farmakologickou účinnost a po aplikaci se uvolňuje po dobu několika dnů (Holan *et al.*, 2011). Použití nosičů se však neomezuje jen na povrchová poranění kůže nebo oka, lze je aplikovat v rámci celého organismu. Zajímavé výsledky byly popsány při použití biodegradovatelného hydrogelu s inkorporovaným PGE2, který byl transplantovaný společně s MSCs do místa srdeční tkáně postižené infarktem. Postupné uvolňování PGE2 zvyšovalo produkci CCL5 a CCL12, které atrahují T lymfocyty do blízkosti MSCs a které následně potlačují proliferaci Tc, a naopak podporují produkci Treg. Tím zajišťují nejen lokální potlačení zánětu, ale také napomáhají toleranci a přežití MSCs v postižené tkáni (Dhingra *et al.*, 2013).

2.3.4.6 Genetické modifikace MSCs

Další metodou, jak zlepšit nebo upravit funkce MSCs, je genové inženýrství. Pomocí tohoto přístupu lze zpomalit stárnutí, zlepšit migrační vlastnosti, zvýšit přežívání i modifikovat imunomodulační vlastnosti MSCs (Nowakowski *et al.*, 2015, De Becker and Riet, 2016). Prostřednictvím retrovirových vektorů lze například snížit expresi MHCI na MSCs (de la Garza-Rodea *et al.*, 2011). Dále bylo popsáno, že MSCs upravené tak, aby produkovaly velké množství VEGF, se po transplantaci podílejí na neovaskularizaci v kožním poranění (Zheng *et al.*, 2008) a že pomocí MSCs produkujících IL-10 je možné docílit snížení funkcí a maturace DC, snížení proliferace a produkce cytokinů prozánětlivými populacemi T lymfocytů a tím zabránit nebo oddálit rozvoj EAE (Payne *et al.*, 2013). MSCs lze samozřejmě modifikovat i tak, aby exprimovaly proteiny, které za normálních podmínek vůbec netvoří. Sullivan *et al.* (2013) pomocí virové transdukce vytvořili MSCs produkující rekombinantní molekulu CTLA4Ig. Zjistili, že upravené buňky snižují expresi IFN- γ a celkově mění imunitní odpověď z Th1 na Th2. V *in vivo* modelu kolagenem indukované artritidy pak dále ověřili funkčnost této terapie, kdy CTLA4Ig působilo synergisticky s MSCs na potlačení zánětlivé odpovědi a rozvoje onemocnění.

3 Cíle práce

Cílem celého projektu je studovat a ovlivnit imunitní odpověď za účelem potlačení nežádoucí zánětlivé reakce s využitím MSCs. Dále modulace vlastností MSCs pomocí imunopresivních látek nebo cytokinů a studium možného využití MSCs aplikovaných lokálně na nanovláknenných nosičích s inkorporovaným CsA.

Zhodnotit migrační a imunomodulační potenciál MSCs aplikovaných na nanovláknenných nosičích

Bylo prokázáno, že MSCs migrují do poškozených tkání i dalších orgánů a tím napomáhají regeneraci a potlačení zánětlivé imunitní odpovědi. V předkládané studii byla analyzována schopnost MSCs migrovat z nanovláknenného nosiče do kožního allotransplantátu a do spádových lymfatických uzlin a následně byl porovnán vliv různých variant terapie na systémovou imunitní odpověď.

Analyzovat vliv MSCs podaných na nanovláknenných nosičích v kombinaci s CsA na lokální zánětlivou odpověď v kožním allotransplantátu

Rejckce transplantátu je komplexní proces, na kterém se podílí velké množství leukocytů. Byl sledován efekt MSCs, aplikovaných na nanovláknenech společně s CsA, na zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů ve štěpu. V návaznosti na zjištěných výsledcích byl detailně popsán mechanismus působení.

Testovat vliv imunopresivních látek na fenotyp MSCs

MSCs se běžně podávají společně s imunopresivy, tyto léky sice primárně cílí na leukocyty, jejich molekulární cíle jsou však exprimovány i MSCs. V rámci projektu byl testován efekt pěti imunopresiv v klinicky relevantních koncentracích na povrchové znaky MSCs a jejich viabilitu.

Studovat mechanismus, kterým MSCs ovlivňují působení imunopresivních látek na rovnováhu mezi různými subpopulacemi T lymfocytů

Nerovnováha mezi T buňkami je častou příčinou rozvoje zánětlivých onemocnění nebo komplikací po transplantacích. Běžně používané imunopresivní látky sice zabraňují těmto problémům, zároveň však představují riziko v podobě nežádoucích účinků. Byl

sledován vliv MSCs podaných společně s imunosupresivními látkami na poměr mezi Th1/Th2/Th17/Treg a Tc lymfocyty a jejich produkci cytokinů.

Popsat vliv systémově podaných MSCs ovlivněných různými cytokiny na akutní fázi zánětu v rohovkovém epitelu

MSCs mají potenciál se díky svým diferenciačním a imunomodulačním účinkům podílet na regeneraci poškozené rohovky. V této studii byly analyzovány migrační a imunomodulační schopnosti MSCs preinkubovaných s IL-1 α , TGF- β nebo IFN- γ na imunologické procesy odehrávající se bezprostředně po poškození oka.

4 Seznam vlastních publikací

4.1 Seznam použitých publikací

Hajkova M., Hermankova B., Javorkova E., Bohacova P., Zajicova A., Holan V., Krulova M. (2017); Mesenchymal stem cells attenuate the adverse effects of immunosuppressive drugs on distinct T cell subpopulations *Stem Cell Rev Rep* 13: 104-115

Hajkova M., Javorkova E., Zajicova A., Trosan P., Holan V., Krulova. (2015); A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017: 11, 1456-1465

Javorkova E., Trosan P., Zajicova A., Krulova M., **Hajkova M.**, Holan V. (2014); Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon- γ -treated mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev* 23:1490-2500

4.2 Seznam ostatních publikací

Trosan P., Javorkova E., Zajicova A., **Hajkova M.**, Hermankova B., Kossl J., Krulova M., Holan V. (2016); The supportive role of insulin-like growth factor-I in the differentiation of murine mesenchymal stem cells into corneal like cells. *Stem Cell Dev* 25: 874-881

Holan V., Hermankova B., Bohacova P., Kossl J., Chudickova M., **Hajkova M.**, Krulova M., Zajicova A., Javorkova E. (2016); Distinct immunoregulatory mechanisms in mesenchymal stem cells: role of the cytokine environment. *Stem Cell Rev Rep* 12: 654-663

Hermankova B., Zajicova A., Javorkova E., Chudickova M., Trosan P., **Hajkova M.**, Krulova M., Holan V. (2015); Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- γ -treated mesenchymal stem cells. *Immunobiology* 141: 577-586

Holan V., Zajicova A., Javorkova E., Trosan P., Chudickova M., **Pavlikova M.**, Krulova M. (2014); Distinct cytokines balance the development of regulatory T cells and interleukin-10-producing regulatory B cells. *Immunology* 141:577-586

5 Výsledky

5.1 Lokální aplikace mezenchymálních kmenových buněk a cyklosporinu A snižuje imunitní odpověď prostřednictvím změny fenotypu makrofágů

Michaela Hájková, Eliška Javorková, Alena Zajícová, Peter Trošan, Vladimír Holář a Magdaléna Krulová

J Tissue Eng Regen Med. 2017: 11, 1456-1465

Imunosupresivní účinky systémově podaných MSCs a imunosupresivních látek již byly dobře zdokumentované. V této studii jsme na myším modelu alogenní transplantace kůže analyzovali mechanismus podílející se na efektu lokálně podaných MSCs v kombinaci s nespecifickou imunosupresí. Nanovláknenné nosiče s inkorporovaným CsA a adhezaní MSCs byly aplikovány na povrch kožních allotransplantátů a byla hodnocena a charakterizována lokální imunitní odpověď. Zjistili jsme, že MSCs jsou schopné migrovat do poraněného místa, po šesti dnech byly detekovány v oblasti štěpu a ve spádových lymfatických uzlinách. U příjemců léčených pomocí MSCs a CsA došlo k významnému snížení počtu makrofágů infiltrujících do štěpu a produkce NO, tento efekt koreloval s poklesem produkce IFN- γ ve štěpu a ve spádových lymfatických uzlinách. Naopak došlo k nárůstu počtu alternativně aktivovaných makrofágů (F4/80⁺CD206⁺ buňky) a produkce IL-10 makrofágy ve štěpu. Schopnost MSCs měnit fenotyp makrofágů z M1 typu na M2 populaci byla potvrzena v *in vitro* systému. Ukázali jsme, že aplikace MSCs v kombinaci s CsA indukuje změnu makrofágů na alternativně aktivovaný fenotyp produkující zvýšené množství IL-10. Tyto změny ve fenotypu a funkci makrofágů mohou představovat jeden z mechanismů imunosupresivních schopností MSCs aplikovaných v kombinaci s CsA.

Můj podíl na publikaci: experimentální část (odběr tkání a izolace buněk, kultivace buněčných suspenzí, ELISA testy, Griessova reakce, cytometrická analýza, PCR, příprava kryožezů a mikroskopická analýza), analýza a interpretace výsledků, psaní manuskriptu.

A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype

Michaela Hajkova¹, Eliska Javorkova^{1,2}, Alena Zajicova², Peter Trosan^{1,2}, Vladimir Holan^{1,2} and Magdalena Krulova^{1,2*}

¹Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

²Department of Transplantation Immunology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Abstract

The immunosuppressive effects of systemically administered mesenchymal stem cells (MSCs) and immunosuppressive drugs have been well documented. We analysed the mechanisms underlying the therapeutic effect of MSCs applied locally in combination with non-specific immunosuppression in a mouse model of allogeneic skin transplantation. The MSC-seeded and cyclosporine A (CsA)-loaded nanofibre scaffolds were applied topically to skin allografts in a mouse model and the local immune response was assessed and characterized. MSCs migrated from the scaffold into the side of injury and were detected in the graft region and draining lymph nodes (DLNs). The numbers of graft-infiltrating macrophages and the production of nitric oxide (NO) were significantly decreased in recipients treated with MSCs and CsA, and this reduction correlated with impaired production of IFN γ in the graft and DLNs. In contrast, the proportion of alternatively activated macrophages (F4/80⁺CD206⁺ cells) and the production of IL-10 by intragraft macrophages were significantly upregulated. The ability of MSCs to alter the phenotype of macrophages from the M1 type into an M2 population was confirmed in a co-culture system *in vitro*. We suggest that the topical application of MSCs in combination with CsA induces a switch in macrophages to a population with an alternatively activated 'healing' phenotype and producing elevated levels of IL-10. These alterations in macrophage phenotype and function could represent one of the mechanisms of immunosuppressive action of MSCs applied in combination with CsA. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 2 September 2014; Revised 30 January 2015; Accepted 29 April 2015

Keywords mesenchymal stem cells; cyclosporine A; macrophages; nanofibres; local immunosuppression

1. Introduction

Various immunosuppressive drugs are frequently used as the first choice of therapy to inhibit a strong immune response occurring after skin transplantation, or to manage harmful inflammatory reactions on the site of skin injury. However, all these non-specific immunosuppressive interventions are regularly associated with side-effects that prevent the use of higher and more effective doses of the drug. To avoid this problem, attempts have been made to reduce the doses of immunosuppressive drugs by their local application or by

their administration in combination with a cell-based therapy (Inoue *et al.*, 2006; Popp *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2009).

In this respect, mesenchymal stem cells (MSCs) have been proposed as a promising therapeutic cell type. These cells can be obtained from the adipose tissue or bone marrow of a particular patient, propagated *in vitro* and therapeutically used as autologous cells. It has been shown that MSCs possess immunomodulatory properties, suppress immune cell functions (Bartholomew *et al.*, 2002; Le Blanc *et al.*, 2003; Abumaree *et al.*, 2012) and support tissue repair by the production of numerous growth and trophic factors (McFarlin *et al.*, 2006). These properties make them a promising tool to attenuate harmful immune responses and to support tissue regeneration. The ability of MSCs to inhibit inflammatory reactions (Zajicova *et al.*, 2010;

*Correspondence to: M. Krulova, Faculty of Science, Charles University, Vinicna 7, Prague 2, 128 43 Czech Republic. E-mail: krulova@natur.cuni.cz

Cejkova *et al.*, 2013), suppress graft-vs-host reaction (Le Blanc *et al.*, 2004; Lazarus *et al.*, 2005) or prolong graft survival (Bartholomew *et al.*, 2002; Casiraghi *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009) has been well documented.

Furthermore, it has been shown that the administration of MSCs in combination with an immunosuppressive drug prolongs allograft survival for a longer period of time than the use of MSCs or the drug alone (Inoue *et al.*, 2006; Popp *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2009). Peng *et al.* (2013), in a clinical pilot study, confirmed that the infusion of MSCs in kidney recipients enabled a reduction in the dosage of conventional immunosuppressive drugs required to maintain long-term graft survival. Although synergistic effects of MSCs and immunosuppressive drugs have been shown in several studies, the exact mechanism of such synergy has not been identified.

After the systemic infusion of MSCs into the blood circulation, a significant proportion of the cells are trapped in various tissues, such as the lung, spleen and liver, which reduces the final number of MSCs acting locally at the site of injury (Gao *et al.*, 2001). Therefore, local application of MSCs may be more effective. However, the absence of a suitable carrier remains the main limitation for such targeted administration of MSCs. Among different cell carriers tested so far, nanofibre scaffolds have proved to be optimal carriers of MSCs for topical application (Shafiee *et al.*, 2011; Cejkova *et al.*, 2013). Moreover, needleless electrospinning technology enables fabrication of biocompatible nanofibres with encapsulated immunosuppressive drugs (Aksungur *et al.*, 2011; Holan *et al.*, 2011). The effectiveness of such drug-loaded scaffolds in the suppression of the local immune reaction has been already demonstrated (Holan *et al.*, 2011).

In this study, we used a mouse model of skin injury to assess the mechanism underlying the immunosuppressive potential of MSCs applied topically on a nanofibre scaffold in combination with nanofibres loaded with the immunosuppressive drug cyclosporine A (CsA). In accordance with our previous results in a damaged ocular surface model (Zajicova *et al.*, 2010), MSCs migrated from the scaffold and were detected in the graft bed and draining lymph nodes (DLNs). The transferred cells altered individual parameters of the local immune response. Among these alterations, a switch in the phenotype of graft-infiltrating macrophages from the proinflammatory M1 type into an alternatively activated 'healing' M2 population, which is characterized by a high production of IL-10 (Kim and Hematti, 2009; Maggini *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014) has been recognized as an important mechanism of MSC-mediated immunosuppression *in vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Mice

BALB/c and C57BL/6J (B6) mice of both sexes, aged 8–12 weeks, were obtained from the breeding unit of the

Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic. The protocol and use of animals was approved by the local animal ethics committee.

2.2. Isolation and culture of adipose tissue-derived MSCs

Inguinal fat pads were harvested from BALB/c mice, washed in phosphate-buffered saline (PBS), minced into pieces and digested with a 1% solution of collagenase I (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS for 60 min at 37°C. The cell suspension was washed in PBS and centrifuged at $250 \times g$ for 8 min; the washing step was repeated three times. The pellet was resuspended and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; PAA Laboratories, Pasching, Austria) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma), antibiotics (100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin) and 10 mM HEPES buffer (hereinafter called 'complete DMEM') in 75 cm² tissue culture flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, with a regular exchange of the culture medium and splitting the cells to maintain an optimal cell concentration. Cells at passage 3–5 were used.

2.3. Characterization of MSCs by flow cytometry

Isolated MSCs were washed in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and labelled for 30 min on ice with allophycocyanine (APC)-labelled monoclonal antibody (mAb) anti-CD44 (clone IM7, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), PE-labelled anti-CD105 (clone MJ7/18, eBioscience, San Diego, CA, USA), PE-labelled anti-CD34 (clone RAM34, BD Pharmingen), FITC-labelled anti-CD90.2 (clone 30-H12, BioLegend, San Diego, CA, USA), PE-labelled anti-CD73 (clone TY/11.8, eBioscience), APC-labelled anti-CD11b (clone M1/70, BioLegend), PE-labelled anti-CD31 (clone MEC 13.3, BD Pharmingen) or PE-labelled anti-CD45 (clone 30-F11, BioLegend). Dead cells were stained using Hoechst 33258 dye (Sigma), added to the samples 15 min before flow-cytometry analysis. Data were collected using a LSRII cytometer (BD Bioscience) and analysed using Gatelologic 400.2A software (Invai, Mentone, Australia).

2.3.1. Differentiation of MSCs to adipocytes and osteoblasts

MSCs growing *in vitro* for 2–3 weeks were cultured in complete DMEM supplemented with specific adipogenic (0.1 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.1 mM indomethacine and 0.5 µg/ml insulin) or osteogenic (0.1 µM dexamethasone, 0.1 mM l-ascorbic acid and 10 mM β-glycerophosphate disodium salt pentahydrate, all from Sigma) components, as described elsewhere (Svobodova *et al.*, 2011). Differentiated MSCs

MSCs induce immunosuppressive macrophages *in vivo*

were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with oil red O (Sigma) or alizarin red S (Sigma).

2.4. Growth of MSCs on a nanofibre scaffold

Nanofibre scaffolds were prepared from polymer polylactic acid (PLA), as described (Zajicova *et al.*, 2010). During this study, nanofibre materials with a mass/unit area of 10 g/m² and containing 10 weight percent (wt%) CsA were used. The nanofibres had a diameter in the range 290–539 nm and contained 10 wt% CsA (i.e. 1 µg CsA/mm²). For the cell transfer, PLA nanofibre scaffolds were cut into squares (approximately 1.5 × 1.5 cm) and fixed into CellCrown inserts (Scaffdex, Tampere, Finland). The inserts with nanofibres were sterilized by UV light, washed in culture medium and transferred into 24-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA). MSCs (200 000) in a volume of 700 µl RPMI 1640 culture medium (Sigma) with 10% FCS were transferred onto the top of the scaffold and cultured for 24 h. We have shown previously that MSCs adhere to, and grow on, nanofibres comparably to their growth on plastic surfaces (Zajicova *et al.*, 2010).

2.5. Experimental groups

The recipients of skin allografts were divided into five groups; one remained untreated (group T), while the others were treated by the application of a nanofibre scaffold without (group S) or with incorporated CsA (group C), or with a nanofibre scaffold seeded with MSCs (group M). Group CM was treated with MSC-seeded and CsA-loaded nanofibres. Naive healthy animals were used as a control (group N). Each group of experimental and control animals contained six to eight mice.

2.6. Skin grafting and MSC transfer

Full-thickness skin grafts from the tail of B6 donors were grafted into BALB/c recipients, according to the technique described by Billingham *et al.* (1954). In brief, BALB/c mice were deeply anaesthetized by intramuscular injection of a mixture of xylazine and ketamine (Rometa, Spofa, Prague, Czech Republic). The top (outer) side of the graft was completely deprived of hairs, to allow a tight contact of the graft and the nanofibre scaffold, and grafts of a size approximately 8 × 8 mm from the tail of B6 donors were grafted onto the dorsal regions of the anaesthetized BALB/c recipients. Nanofibre scaffolds of size 10 × 10 mm, with or without growing MSCs, were transferred (cell side facing down) onto the top of the graft. In the therapy that combined MSCs and CsA (group CM), two nanofibre scaffolds were applied to the graft, the first seeded with MSCs and the second loaded with CsA.

To trace the fate and survival of MSCs after their transfer onto the graft, the cells were labelled with the

fluorescent vital dye PKH26 (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma), according to the manufacturer's instructions, cultured for 24 h on a nanofibre scaffold and transferred onto the graft.

2.7. Immunofluorescent staining

The recipients of grafts were sacrificed 6 days after cell transfer, and the grafts were dissected and placed for 1 h into 4% paraformaldehyde to prepare frozen sections. Cryosections at a thickness of 5 µm were prepared, using a Leica CM 3050 S cryostat (Leica, Wetzlar, Germany), and were either mounted with Mowiol (Calbiochem, Billerica, MA, USA) containing DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or were stained. For immunofluorescent staining, the sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, washed in PBS, blocked by 10% BSA in PBS containing 0.1% Tween-20 for 30 min, and then incubated with CD11b mAb (clone M1/70, Exbio, Czech Republic) at 4°C overnight. After washing with PBS, the sections were incubated with AlexaFluor 488-conjugated Ab (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 45 min. The slides were then mounted with Mowiol containing DAPI. Sections were analysed using an Olympus Cell R fluorescent microscope.

2.8. Production of cytokines by lymph node cells

Axillary and brachial DLNs from control and grafted BALB/c mice were obtained 6 days after transplantation, and a single cell suspension was prepared in complete RPMI 1640 medium. LNCs (1.5 × 10⁶ cells/ml) were cultured in a volume of 1.5 ml complete RPMI 1640 medium in 24-well tissue culture plates (Nunc), unstimulated or stimulated with irradiated (3000 Rad) spleen cells (1.5 × 10⁶ cells/ml) from B6 mice used as a source of antigen. The supernatants were harvested after 72 h (IFN γ determination) or 96 h (IL-10 determination) of incubation (these intervals were selected on the basis of our preliminary experiments determining the peaks of production). The production of IL-10 and IFN γ was quantified by ELISA, using cytokine-specific capture and detection mAbs obtained from BD Pharmingen, as described previously (Zajicova *et al.*, 2010).

2.8.1. Co-cultivation of lymph node cells with macrophages

Macrophages were prepared by washing the peritoneal cavity of unstimulated BALB/c mice, as described (Kruľova *et al.*, 2002), and were co-cultured in 48-well tissue culture plates (Costar) in a volume of 0.6 ml complete RPMI 1640 medium with LNCs (2 × 10⁶ cells/ml) and 1 × 10⁶/ml irradiated (3000 R) spleen cells from B6 mice. After 48 h of co-cultivation, the production of nitric oxide (NO) in the supernatants was determined.

2.8.2. NO determination

The concentrations of NO were measured by the Griess reaction (Green *et al.*, 1982). In brief, 100 μ l of the tested supernatant was incubated with 50 μ l 1% sulphanilamide (in 2.5% H₃PO₄) and 50 μ l 0.3% *N*-1-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride (in 2.5% H₃PO₄). Nitrite was quantified by spectrophotometry, using sodium nitrite as a standard.

2.9. Characterization of cells isolated from the graft by flow cytometry

The recipients of grafts were sacrificed 6 days after cell transfer and the grafts were dissected, minced into pieces and digested with a 1% solution of collagenase II (Sigma) in PBS for 90 min at 37°C. The cell suspension was washed in PBS and centrifuged (250 \times *g*, 8 min). Isolated cells were stained for 30 min on ice with FITC-labelled anti-CD19 (clone 6D5, BioLegend), FITC-labelled anti-CD4 (clone GK1.5, BD Pharmingen), APC-labelled anti-CD8a (clone 53-6.7, BioLegend), APC-labelled mAb anti-CD11b (clone M1/70, BioLegend), PE-labelled mAb anti-F4/80 (clone BM8, BioLegend) and FITC-labelled mAb anti-CD206 (clone C068C2, BioLegend), or tested for the presence of IL-10 by intracellular labelling. Hoechst 33258 (Sigma) was used to exclude dead cells. Data were collected using an LSRII cytometer (BD Biosciences) and analysed using Gatelagic 400.2A software.

2.9.1. Intracellular staining

Cells isolated from grafts were resuspended in complete RPMI 1640 medium and were stimulated with PMA (20 ng/ml Sigma), ionomycin (500 ng/ml, Sigma) and Brefeldin A (5 μ g/ml, eBioscience). After 4 h of incubation, the cells were harvested and washed with PBS. Before intracellular staining, the cells were incubated for 30 min on ice with FITC- or PE-labelled mAb anti-CD45 (clone 30-F11, BioLegend), PE-labelled mAb anti-F4/80 and Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for the staining of dead cells. For intracellular staining, the cells were fixed and permeabilized using a Fixation/Permeabilization Buffer Staining Kit (eBioscience), according to the manufacturer's instructions. For the detection of IL-10, the cells were stained with APC-labelled mAb anti-IL-10 (clone JES5-16E3, eBioscience) for 30 min at 25°C. Data were collected using an LSRII cytometer (BD Biosciences) and analysed using Gatelagic 400.2A software.

2.10. Skin graft explants

Skin grafts were removed on day 6 after transplantation and each was divided into four pieces of approximately

the same size. Individual pieces were transferred into the wells of 48-well tissue culture plates (Costar) with 0.6 ml complete RPMI 1640 medium. Graft explants were cultured for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂; the supernatants were harvested and the production of IFN γ and IL-10 was tested by ELISA. Production of NO was determined by the Griess reaction. Concentrations of cytokines and NO were calculated as the average of the four values obtained from individual pieces of the graft.

2.10.1. Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR)

The expression of the genes *iNOS*, *IL-1 β* and *IFN γ* was detected using RT–PCR. Graft recipients were killed on day 6 after transplantation, the grafts were dissected, cut into small pieces and the total RNA was isolated using NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed into cDNA with the use of a SuperScript III RT–PCR Kit (Invitrogen). The cDNA samples were first normalized to yield equal amounts of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene (sense 5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3', antisense 5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'). Subsequently, the samples were hybridized with 5'- and 3' primers for *iNOS* (sense 5'-TGG GAA TGG AGA CTG TCC CAG-3', antisense 5'-GGG ATC TGA ATG TGA TGT TTG-3'), *IL-1 β* (sense 5'-CAG GAT GAG GAC ATG AGC ACC-3', antisense 5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3') and *IFN γ* (sense 5'-TAC TGC CAC GGC ACA GTC ATT GAA-3', antisense 5'-GCA GCG ACT CCT TTT CCG CTT CCT-3'). The PCR products were electrophoresed on an ethidium bromide-stained agarose gel.

2.11. Co-cultivation of macrophages and MSCs

Peritoneal exudate cells, obtained by washing the peritoneal cavity of unstimulated BALB/c mice, as previously described (Krušova *et al.* 2002), were used as a source of macrophages. Macrophages or MSCs were cultured alone or co-cultured (M \emptyset :MSCs) at ratios of 5:1, 10:1 and 20:1 for 4 days. In some wells, mouse recombinant IFN γ (10 ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) was added into the medium as a control. The frequency of F4/80⁺CD206⁺ cells was determined by flow cytometry.

2.12. Statistics

All results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SE). The statistical significance of differences between the means of individual groups was calculated using one-way analysis of variance (ANOVA); $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of BALB/c MSCs

The expression of cell surface markers by adipose tissue-derived MSCs derived from BALB/c mice was examined by flow cytometry. MSCs expressed CD44, CD90, CD105 and CD73 molecules but were negative for CD11b, CD45, CD34 and CD31 (Figure 1A). Moreover, MSCs showed a typical fibroblast-like morphology and were able to differentiate into adipogenic (Figure 1B), osteogenic (Figure 1C) and chondrogenic lineages (data not shown).

3.2. MSC tracking

To determine MSC migration, a nanofibre scaffold seeded with PKH26-labelled MSCs was applied onto a skin graft, and the distribution of the labelled cells was determined 6 days later by flow cytometry. As demonstrated in Figure 1, PKH26-positive MSCs were detected in the skin graft environment (Figure 1E) and also in the DLNs (Figure 1F). MSCs and CD11b-positive cells were detected as individual cell populations; < 2% of cells in the graft were double-positive, as demonstrated by immunohistochemistry (Figure 1G).

3.3. Production of cytokines by lymph node cells (LNCs)

To assess the immunomodulatory effect of locally administered MSCs, DLNs were harvested on day 6 after MSC transfer, and the ability of LNCs to produce IFN γ and IL-10 was tested. As shown in Figure 2, there was a trend towards a decrease in the production of IFN γ by LNCs from mice treated with MSCs or MSCs plus CsA (Figure 2A), while the production of IL-10 was simultaneously significantly enhanced in the group treated with MSCs plus CsA (Figure 2B).

In addition, the ability of LNCs from treated mice to stimulate NO production by macrophages from control mice was tested. LNCs from control and grafted mice were co-cultured with macrophages from naive mice in the presence of B6 LNCs (as a source of allo-antigens), and the production of NO by macrophages was determined. LNCs from grafted, untreated mice activated macrophages to produce a high level of NO, but the ability to stimulate NO production was significantly decreased in LNCs from grafted mice and treated with MSCs or MSCs plus CsA (Figure 2C).

3.4. Analysis of cell populations infiltrating the skin allograft

To analyse changes in graft-infiltrating cell populations, single-cell suspensions from the grafts were prepared on

day 6 after transplantation, and the frequencies of leukocyte populations were determined. CD45⁺ cells represented 5–10% of the cells obtained from the graft after enzymatic digestion, and the population of CD45⁺ cells obtained from untreated grafts or grafts treated with MSCs and/or CsA showed no significant differences in the percentage of B lymphocytes (CD19⁺ cells) or helper (CD4⁺) and cytotoxic (CD8⁺) T lymphocytes (data not shown). However, the frequency of CD45⁺CD11b⁺ cells was significantly decreased in all variants of the treatment, with the largest decline in the group with combined MSCs plus CsA therapy (Figure 3A). Similarly, the production of NO by graft-infiltrating macrophages was significantly lower in the treated groups than in untreated recipients (Figure 3B). The significantly decreased production of NO in the MSCs plus CsA-treated group correlated with the impaired IFN γ production by graft-infiltrating cells in this group (Figure 3C). In agreement with the above results, an analysis of the expression of genes for the proinflammatory molecules *iNOS*, *IL-1 β* and *IFN γ* in graft explants confirmed the low expression in the MSC-treated groups with the biggest reduction in the group treated with MSC-seeded and CsA-loaded nanofibres (Figure 3D).

3.5. Analysis of the phenotype of graft-infiltrating macrophages

The population of F4/80⁺CD206⁺ cells, which are thought to be an immunosuppressive subpopulation of alternatively activated macrophages (M2), was determined in graft explants in individual groups of animals. The populations of these immunosuppressive macrophages were increased in all treated groups, with the highest increase in the group treated with MSCs and CsA (Figure 4A). Similarly, the production of IL-10 by graft explants was highest in the group treated with MSCs and CsA (Figure 4B). Using surface staining for F4/80 and CD206 and intracellular staining for IL-10 (Kim and Hematti, 2009; Cho *et al.*, 2014), a significant increase in the number of F4/80⁺CD206⁺IL-10⁺ cells was detected in the group of grafted mice treated with MSCs and CsA (Figure 4C).

3.6. The effect of MSCs on CD206 expression by macrophages *in vitro*

To confirm the switch to an alternatively activated phenotype in macrophages in the presence of MSCs, peritoneal macrophages from control naive mice were cultured with or without MSCs, and the expression of the CD206 molecule was determined. The frequency of F4/80⁺/CD206⁺ cells was significantly increased when macrophages were co-cultured with MSCs, in comparison to macrophages cultured alone (Figure 5). Furthermore, the inclusion of excess exogenous IFN γ , a molecule that induces classically activated macrophages, into the

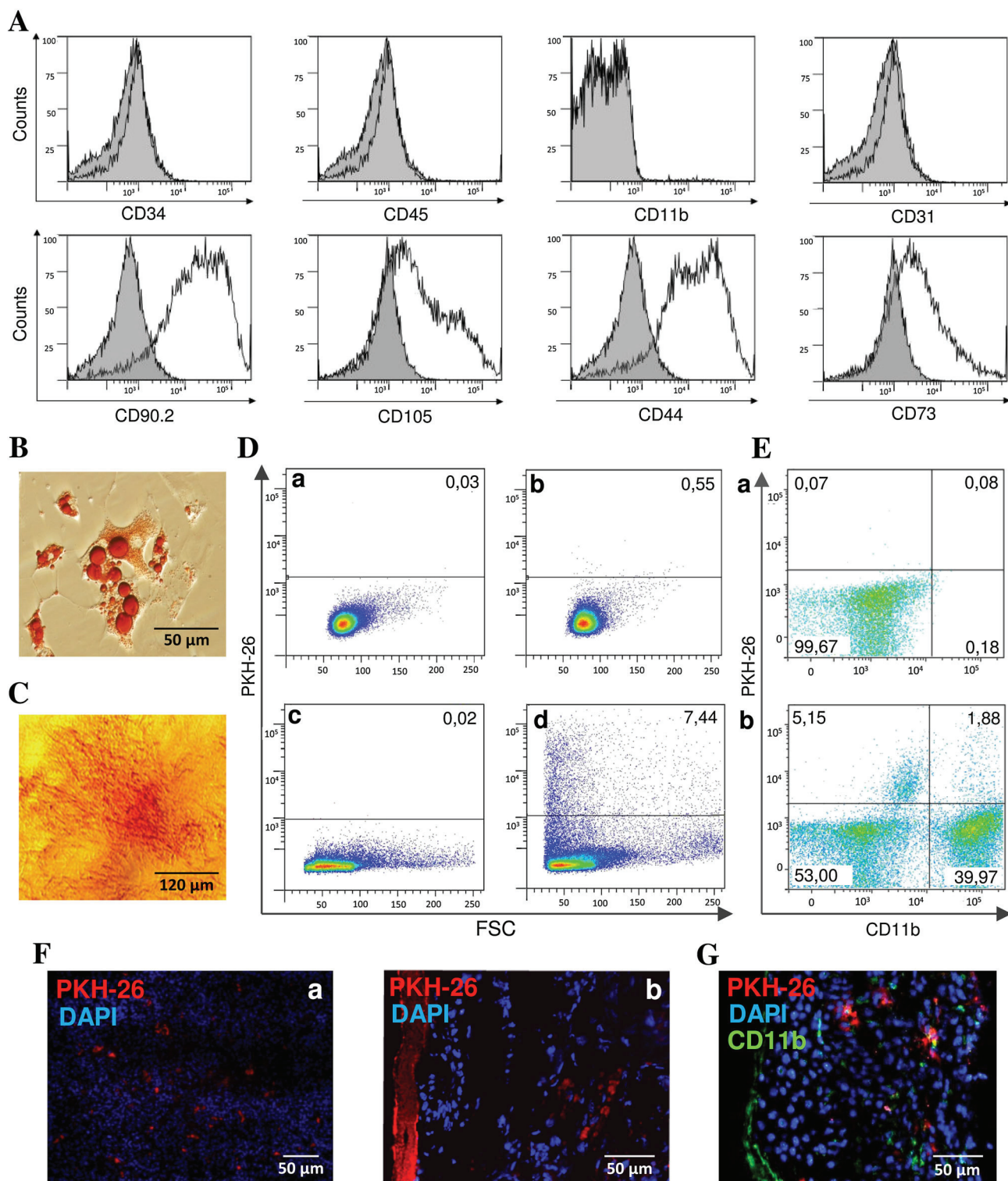


Figure 1. Phenotype characterization of adipose-tissue derived MSCs. Expression of CD34, CD45, CD11b, CD31, CD90.2, CD105, CD44 and CD73 markers was assessed by flow cytometry (A). MSCs were cultured in adipogenic medium and stained with oil red O (B). MSCs were cultured in osteogenic medium and stained with alizarin red S (C). One representation of four similar experiments is shown: distribution of PKH26-labelled MSCs in graft recipients; skin graft recipients were (Da,c) untreated or (Db, Dd, Eb, F, G) treated with PKH26-labelled MSCs seeded on a nanofibre scaffold; representative dot-plots indicate the presence of MSCs in DLNs (Db) or grafts (Dd, Eb) and CD11b-positive cells in grafts (Eb) on day 6 after transplantation. (Ea) Dot-plot showing non-labelled cells. In addition, 5- μ m cryosections from the skin grafts were prepared; photomicrographs show the distribution of MSCs (red) (F) and CD11b-positive cells (green) in DLNs (Fa) or skin graft (Fb, G); the nuclei are stained blue by DAPI. Representative images from four independent determinations are shown

MSCs induce immunosuppressive macrophages *in vivo*

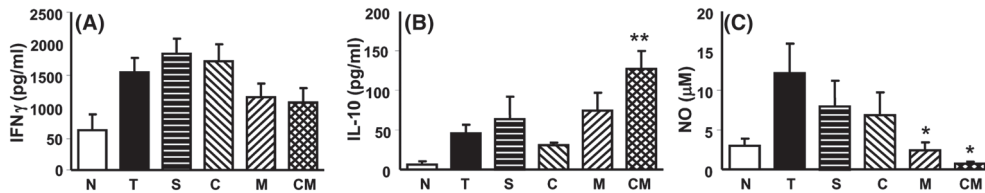


Figure 2. Analysis of IL-10 and IFN γ production by DLN cells from grafted and MSC-treated mice. LNCs isolated from skin graft recipients were cultured in the presence of irradiated B6 spleen cells. The production of IFN γ (A) and IL-10 (B) in the supernatants was determined by ELISA. To characterize the ability of LNCs to stimulate NO production, LNCs were co-cultured with macrophages from control mice and with irradiated B6 spleen cells, and the NO production was measured by the Griess reaction (C); N, control naive animals. Mice in groups 1–5 received a skin allograft and were untreated (T), treated with a nanofibre scaffold without (S) or with (SC) incorporated CsA, with MSC-seeded nanofibre scaffold (M) or with a combination of MSC-seeded and CsA-loaded nanofibre scaffolds (CM). Each bar represents mean \pm SE from six independent experiments; *values significantly different (* p < 0.05, ** p < 0.01) from group T

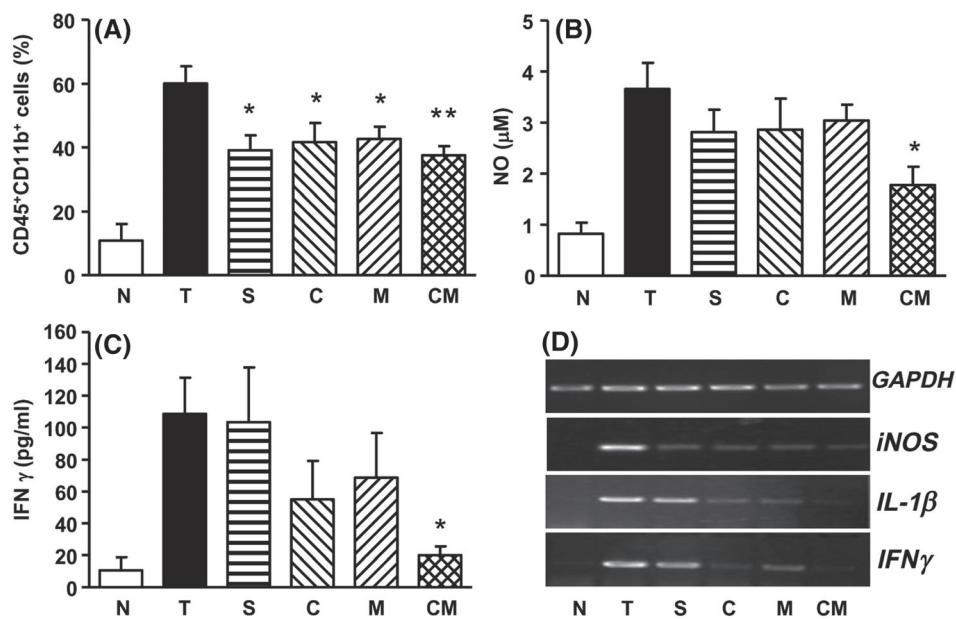


Figure 3. Analysis of immunological parameters in skin allografts treated with MSCs. The frequency of CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ cells in skin grafts was determined by flow cytometry (A). The NO production by graft explants was measured by the Griess reaction (B) and the production of IFN γ (C) was determined by ELISA. The expression of genes for *iNOS*, *IL-1 β* and *IFN γ* was determined by RT-PCR (D); a representative experiment is shown; N, control naive animals. Mice in groups 1–5 received a skin allograft and were untreated (T), treated with a nanofibre scaffold without (S) or with (C) incorporated CsA, with MSC-seeded nanofibre scaffold (SC) or with a combination of MSC-seeded and CsA-loaded nanofibre scaffolds (CM). Each bar represents mean \pm SE from four to six independent experiments; *values significantly different (* p < 0.05) from group T

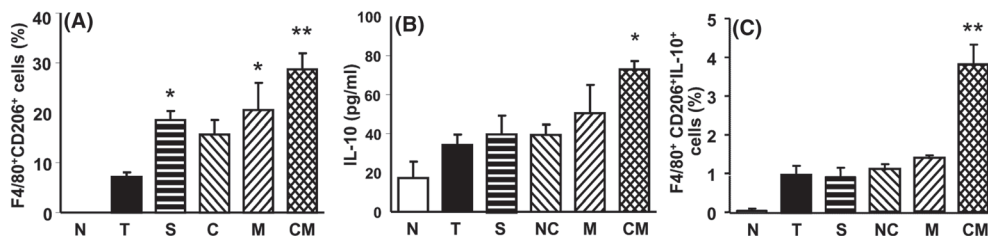


Figure 4. The phenotype and IL-10 production profile of graft-infiltrating macrophages. The frequency of F4/80 $^{+}$ CD206 $^{+}$ cells in skin grafts was determined by flow cytometry (A). The production of IL-10 by graft explants was quantified by ELISA (B). The percentage of F4/80 $^{+}$ CD206 $^{+}$ IL-10 $^{+}$ cells (C) was determined by flow cytometry after 4 h incubation with PMA, ionomycin and Brefeldin A; N, control naive animals. Mice in groups 1–5 received a skin allograft and were untreated (T), treated with a nanofibre scaffold without (S) or with (SC) incorporated CsA, with MSC-seeded nanofibre scaffold (C) or with a combination of MSC-seeded and CsA-loaded nanofibre scaffolds (CM). Each bar represents mean \pm SE from four to eight independent experiments (at least six mice/group); *values significantly different (* p < 0.05, ** p < 0.001) from group T

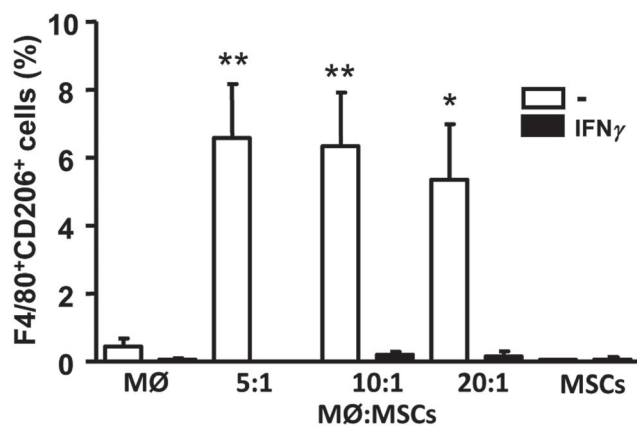


Figure 5. The effect of MSCs on macrophage phenotype *in vitro*. Macrophages (MØ) and MSCs were cultured separately or co-cultured (MØ:MSCs) at the indicated ratios. The frequency of F4/80⁺CD206⁺ cells was determined by flow cytometry. Cells were either untreated (-) or cultured in the presence of IFN γ . Each bar represents mean \pm SE from six independent experiments; *values significantly different (* p < 0.05, ** p < 0.01) from control (unstimulated macrophages)

co-culture system abrogated the development of alternatively activated CD206⁺ macrophages (Figure 5).

4. Discussion

Among different cell types studied in pathophysiological situations so far, MSCs have shown great promise in numerous clinical trials and are thus considered to be hopeful candidates for regenerative and reparative medicine (Wagner *et al.*, 2009). On the side of injury, they contribute to the healing process by inhibiting inflammation, the production of growth and trophic factors and by a direct differentiation into different cell types (McFarlin *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2008; Karp and Leng Teo, 2009). However, the number of systemically administered MSCs that reach the site of injury is low, and thus attempts are being made to apply therapeutic cells locally. Such targeted application of MSCs requires a suitable carrier, which has to be non-toxic and biocompatible and must have mechanical properties optimal for cell transfer. Most of these demands are met by nanofibre scaffolds, which, furthermore, can be uploaded with pharmacologically active agents and thus can serve as drug carriers for local treatment (McFarlin *et al.*, 2006; Holan *et al.*, 2011).

In this study we established a model of skin allotransplantation in mice which enables analysis of various treatment protocols, including the use of MSC-seeded nanofibres and the local administration of an immunosuppressive drug. We have demonstrated previously the therapeutic potential of a MSC-seeded nanofibre scaffold in a model of ocular surface injury (Zajicova *et al.*, 2010; Holan and Javorkova, 2013) and a successful incorporation of CsA into nanofibres (Holan *et al.*, 2011). We have also shown that the pharmacological properties of CsA

are not impaired by the electrospinning procedure used for nanofibre preparation, and that the drug is released from the nanofibres gradually after their topical application *in vivo* (Holan *et al.*, 2011). In the present study, we simultaneously applied allograft MSC-seeded and CsA-loaded nanofibres onto skin and assessed the mechanisms of their therapeutic action.

Although we did not observe significant changes in the percentage of CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ and CD11b⁺ cells in the DLNs of treated animals (data not shown), the production of IFN γ and IL-10 by LNCs from mice treated with MSCs or MSCs plus CsA was altered. LNCs from mice treated with MSCs produced lower levels of IFN γ and their ability to stimulate NO production by naive macrophages was considerably decreased. Simultaneously, the production of IL-10 by graft-infiltrating macrophages was significantly enhanced. This shows that MSCs reduce the production of the proinflammatory cytokine IFN γ and that this effect is more pronounced in animals treated with MSCs in combination with CsA.

We further focused on a more detailed analysis of the local host inflammatory reaction in the graft. The involvement of macrophages as effector cells during allograft rejection has been well documented (Yamamoto *et al.*, 1998; Krulova *et al.*, 2002). We found that macrophages represent the most abundant population (up to 60%) of CD45⁺ graft-infiltrating cells (data not shown). The percentage of graft-infiltrating macrophages was decreased by the treatment with MSCs or CsA, with the most pronounced decline in the frequency of CD45⁺CD11b⁺ cells after the application of MSCs in combination with CsA. Activated macrophages had been shown to be a principal cell population producing NO, and we had described previously that the production of NO by graft-infiltrating macrophages is dependent on the presence of activated CD4⁺ T cells and their production of IFN γ (Krulova *et al.*, 2002). Since CsA used in our study interferes with T cell activation and the production of IFN γ , the lowest levels of IFN γ were detected in grafts covered with MSC- and CsA-loaded nanofibres. This observation is in agreement with our previous finding that nanofibre scaffolds with incorporated CsA suppress the production of proinflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo* (Holan *et al.*, 2011). Impaired production of IFN γ in recipients treated with MSCs and CsA correlated with decreased NO production by graft-infiltrating macrophages. In contrast, IL-10 was upregulated in the MSCs- or MSCs plus CsA-treated group. The ability of nanofibres to absorb wound exudates, prevent the drying up of the wound, protect the wound from bacterial infection and allow gas permeation (Dubsky *et al.*, 2012; Goh *et al.*, 2013) can explain the reduced frequency of macrophages and decreased NO production in mice treated with a nanofibre scaffold alone.

It has been shown that macrophages can be phenotypically polarized into a classically activated M1 or an alternatively activated 'healing' M2 population (Gordon, 2003; Martinez *et al.*, 2008; Kim and Hematti, 2009; Sica and Mantovani, 2012) that is able to participate in

immunosuppression and reparative processes (Mantovani *et al.*, 2013). We observed that macrophages cultured in the presence of MSCs have a higher level of expression of CD206, which is suggested to be a marker upregulated in the M2 population. This population is characterized by higher IL-10 production and decreased secretion of IL-12 and TNF α (Porcheray *et al.*, 2005; Kim and Hematti, 2009; Cho *et al.*, 2014). Indeed, in our model, the treatment of graft recipients with MSCs plus CsA induced a significant increase in CD206 expression and IL-10 production by graft-infiltrating macrophages. A switch in macrophage phenotype has also been observed in a model of rat islet allografts (Kim *et al.*, 2011) and murine orthotopic tracheal transplantation (Guo *et al.*, 2013).

In summary, we showed that local application of MSC-seeded and CsA-loaded nanofibre scaffolds attenuated the inflammatory reaction at the site of injury. The switch in the phenotype of macrophages from the NO-producing M1 type to an IL-10-producing, alternatively activated

M2 population might represent the important mechanism of MSC-induced immunosuppression *in vivo*.

Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of Charles University (Grant Nos 546613 and 668012), the Grant Agency of the Czech Republic (Grant Nos P304/11/0653, P301/11/1568 and 14-12580S), the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (Grant No. NT/14102) and Charles University (Grant Nos SVV 260083 and UNCE 204013).

References

- Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, *et al.* 2012; Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* **8**: 375–392.
- Aksungur P, Demirbilek M, Denkbas EB, *et al.* 2011; Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *J Control Release* **151**: 286–294.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, *et al.* 2002; Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol* **30**: 42–48.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB, *et al.* 1954; Quantitative studies on tissue transplantation immunity. I. The survival times of skin homografts exchanged between members of different inbred strains of mice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **143**: 43–58.
- Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, *et al.* 2008; Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semi-allogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol* **181**: 3933–3946.
- Cejkova J, Trosan P, Cejka C, *et al.* 2013; Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Exp Eye Res* **116**: 312–323.
- Cho D, Kim MR, Jeong H, *et al.* 2014; Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med* **46**: e70.
- Ding YC, Xu DM, Feng G, *et al.* 2009; Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* **58**: 1797–1806.
- Dubsky M, Kubinova S, Sirc J, *et al.* 2012; Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *J Mater Sci Mater Med* **23**: 931–941.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, *et al.* 2001; The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* **169**: 12–20.
- Ge W, Jiang J, Baroja ML, *et al.* 2009; Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am J Transpl* **9**: 1760–1772.
- Goh YF, Shakir I, Hussain R 2013; Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing. *J Mater Sci* **48**: 3027–3054.
- Gordon S 2003; Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**: 23–35.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, *et al.* 1982; Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**: 131–138.
- Guo ZX, Zhou XH, Li J, *et al.* 2013; Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *Int Immunopharmacol* **15**: 726–734.
- Holan V, Chudickova M, Trosan P, *et al.* 2011; Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *J Control Release* **156**: 406–412.
- Holan V, Javorkova E 2013; Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction. *Stem Cell Rev Rep* **9**: 609–619.
- Inoue S, Popp FC, Koehl GE, *et al.* 2006; Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* **81**: 1589–1595.
- Karp JM, Leng Teo GS 2009; Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* **4**: 206–216.
- Kim J, Hematti P 2009; Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* **37**: 1445–1453.
- Kim YH, Wee YM, Choi MY, *et al.* 2011; Interleukin (IL)-10 induced by CD11b $^{+}$ cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts. *Mol Med* **17**: 697–708.
- Krulova M, Zajicova A, Fric J, *et al.* 2002; Allo-antigen-induced, T cell-dependent production of nitric oxide by macrophages infiltrating skin allografts in mice. *Transpl Int* **15**: 108–116.
- Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, *et al.* 2005; Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transpl* **11**: 389–398.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, *et al.* 2004; 2004; Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haplo-identical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**: 1439–1441.
- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, *et al.* 2003; Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* **57**: 11–20.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, *et al.* 2010; Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* **5**: e9252.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, *et al.* 2013; Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* **229**: 176–185.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, *et al.* 2008; Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* **13**: 453–461.
- McFarlin K, Gao X, Liu YB, *et al.* 2006; Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regen* **14**: 471–478.

- Peng Y, Ke M, Xu L, *et al.* 2013; Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation* **95**: 161–168.
- Popp FC, Eggenhofer E, Renner P, *et al.* 2008; Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl Immunol* **20**: 55–60.
- Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, *et al.* 2005; Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* **142**: 481–489.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, *et al.* 2008; Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* **180**: 2581–2587.
- Shafiee A, Soleimany M, Chamberheidari GA, *et al.* 2011; Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res* **99**: 467–478.
- Sica A, Mantovani A 2012; Macrophage plasticity and polarization: *in vivo veritas*. *J Clin Invest* **122**: 787–795.
- Svobodova E, Krulova M, Zajicova A, *et al.* 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 Dev* **21**: 901–910.
- Wagner J, Kean T, Young R, *et al.* 2009; Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 2009; **20**: 531–536.
- Yamamoto N, Einaga-Naito K, Kuriyama M, *et al.* 1998; Cellular basis of skin allograft rejection in mice: specific lysis of allogeneic skin components by non-T cells. *Transplantation* **65**: 818–825.
- Zajicova A, Pokorna K, Lencova A, *et al.* 2010; Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds. *Cell Transpl* **19**: 1281–1290.

5.2 Mezenchymální kmenové buňky zeslabují nežádoucí účinky imunosupresivních látek na různé populace T buněk

Michaela Hájková, Barbora Heřmánková, Eliška Javorková, Pavla Boháčová, Alena Zajícová, Vladimír Holáň a Magdaléna Krulová

Stem Cell Rev Rep. 2017: 13, 104-115

Imunosupresivní látky jsou často používány pro léčbu nežádoucích imunitních reakcí, nicméně jejich klinické využití je limitováno škodlivými vedlejšími účinky. Kombinovaná aplikace imunosupresiv s MSCs nabízí slibný alternativní přístup, který umožňuje snížení dávek imunosupresivních látek a současně nemění, nebo dokonce zlepšuje výsledek terapie. Předkládaná studie si klade za cíl určit efekty imunosupresiv na různé subpopulace T buněk a prozkoumat účinnost léčby založené na MSCs v kombinaci s imunosupresivními látkami. Testovali jsme účinek pěti běžně používaných imunosupresiv s rozdílnými mechanismy působení (cyklosporin A, mykofenolát mofetil, rapamycin a dva glukokortikoidy – prednizon a dexamethazon) v kombinaci s MSCs na viabilitu a aktivaci myších CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů, na proporcii mezi Th17 (RORγt⁺), Th1 (T-bet⁺), Th2 (GATA-3⁺) a Treg (Foxp3⁺) buňkami a na produkci cytokinů souvisejících s těmito populacemi (IL-17, IFN-γ, IL-4 a IL-10). Ukázali jsme, že MSCs modulují působení imunosupresiv a že v kombinaci s imunosupresivními látkami vykazují různý vliv na aktivaci buněk a rovnováhu mezi různými subpopulacemi T lymfocytů, potlačují prozánětlivé populace T buněk a současně podporují funkce protizánětlivých Treg lymfocytů. Tyto výsledky naznačují, že terapie založená na MSCs by mohla představovat účinnou strategii pro potlačení negativních vlivů imunosupresivních látek na imunitní systém.

Můj podíl na publikaci: experimentální část (izolace a kultivace MSCs, izolace a kultivace buněčných kultur ze sleziny, cytometrická analýza), analýza a interpretace výsledků, psaní manuskriptu.

Mesenchymal Stem Cells Attenuate the Adverse Effects of Immunosuppressive Drugs on Distinct T Cell Subpopulations

Michaela Hajkova^{1,2} · Barbora Hermankova^{1,2} · Eliska Javorkova^{1,2} ·
Pavla Bohacova^{1,2} · Alena Zajicova² · Vladimir Holan^{1,2} · Magdalena Krulova^{1,2}

Published online: 19 November 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Immunosuppressive drugs are widely used to treat undesirable immune reaction, however their clinical use is often limited by harmful side effects. The combined application of immunosuppressive agents with mesenchymal stem cells (MSCs) offers a promising alternative approach that enables the reduction of immunosuppressive agent doses and simultaneously maintains or improves the outcome of therapy. The present study aimed to determinate the effects of immunosuppressants on individual T cell subpopulations and to investigate the efficacy of MSC-based treatment combined with immunosuppressive drugs. We tested the effect of five widely used immunosuppressants with different action mechanisms: cyclosporine A, mycophenolate mofetil, rapamycin, and two glucocorticoids - prednisone and dexamethasone in combination with MSCs on mouse CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte viability and activation, Th17 (ROR γ t⁺), Th1 (T-bet⁺), Th2 (GATA-3⁺) and Treg (Foxp3⁺) cell proportion and on the production of corresponding key cytokines (IL-17, IFN γ , IL-4 and IL-10). We showed that MSCs modulate the actions of immunosuppressants and in combination with immunosuppressive drugs display distinct effect on cell activation and balance among different T lymphocytes subpopulations and exert a suppressive effect on proinflammatory T cell subsets while promoting the functions of anti-inflammatory Treg lymphocytes. The results

indicated that MSC-based therapy could be a powerful strategy to attenuate the negative effects of immunosuppressive drugs on the immune system.

Keywords Mesenchymal stem cells · Immunosuppressive drugs · Stem cell therapy · T cells · Immunomodulation

Introduction

Immunosuppressive drugs are widely used to treat autoimmune or inflammatory diseases and to prevent the rejection of transplanted organs or tissues. However, their impact is often accompanied by unwanted harmful side effects such as nephrotoxicity or osteoporosis, which may diminish their overall benefits [1]. The combined application of immunosuppressive agents with mesenchymal stem cells (MSCs)-based therapy offers a promising alternative strategy enabling immunosuppressive drug doses to be reduced or improving their efficacy.

MSCs represent a heterogenous population of multipotent stem cells, which can be isolated from different tissues including heart, spleen, bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue [2, 3]. One of crucial characteristics of MSCs is their ability to regulate immune response. It has been well documented that MSCs inhibit lymphocyte proliferation, suppress production of proinflammatory cytokines and alter the balance of Th1/Th2/Th17/Treg lymphocytes [4–6]. In addition, the secretion of various growth and trophic factors [7] enables them to support tissue regeneration [8, 9], inhibit apoptosis and exert a cytoprotective effect [10, 11]. Together with their low immunogenicity, MSCs provide promising features for their use in treating many harmful immune reactions [12–14].

There are a few reports describing the potential therapeutic effect of MSCs used in combination with immunosuppressive

✉ Magdalena Krulova
magdalena.krulova@natur.cuni.cz

¹ Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Vinicna 7, 12843 Prague 2, Czech Republic

² Department of Transplantation Immunology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

drugs that yielded inconsistent results. In an *in vitro* model of allogeneic response mycophenolate mofetil (MMF) promoted the inhibitory effect of MSCs; cyclosporine A (CsA), tacrolimus and rapamycin (Rapa) antagonized it and dexamethasone (Dex) had no effect [15]. However, Hoogduijn et al. [16] demonstrated that preincubation of MSCs with calcineurin inhibitors increased the efficacy of MSCs to regulate peripheral blood mononuclear cells proliferation whereas MMF or Rapa had no effect. Moreover, they pointed out the risk of toxicity of high doses of some immunosuppressants on MSCs. On the contrary, Chen et al. [17] showed that preincubation with CsA resulted in inhibition of MSC apoptosis. Therapy combining MSCs and different immunosuppressive drugs has been tested in *in vivo* animal models. It has been described that the combined application of MMF and MSCs leads to prolonged allograft survival [18, 19] and promising results were also obtained after application of MSCs with Rapa [20, 21]. In our recent report we showed, that the combination of MSCs and CsA led to a super-additive immunosuppressive effect in a model of skin allograft transplantation [22].

It has been shown that MSCs in combination with immunosuppressive drugs provide further potential benefits in the treatment of several disorders and are a perspective option for cell therapy [23–25]. MSCs are now used in more than 500 registered clinical trials (<http://clinicaltrials.gov/>). However, so far, the mechanisms of MSC interaction with different immunosuppressive drugs and how they affect the treatment of inflammatory reaction remains unclear. In this study, we aimed to investigate influence of MSCs on the effects of clinically relevant doses [15, 26] of five immunosuppressive drugs with different mechanisms of action (calcineurin inhibitor - CsA, mTOR inhibitor - Rapa, inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor - MMF and two steroids - Dex and prednisone (Pred)). We demonstrated that MSCs in combination with immunosuppressive drugs modulate the adverse effects of immunosuppressive agents on T cells, direct differentiation of naïve T cells toward distinct functional subsets of T lymphocytes (Th17, Th1, Th2, Tc, Treg) and regulate intracellular cytokine expression by these populations. Our study suggest that application of MSCs affects the therapeutic effectiveness of immunosuppressive medication. These findings are important for the potential use of MSCs in combination with immunosuppressive drugs in clinical practice.

Materials and Methods

Mice

Female BALB/c mice at the age of 8–12 weeks were obtained from the breeding unit of the Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic. The protocol and use of animals was approved by the local Animal Ethics Committee.

Isolation and Culture of MSCs

The inguinal fat pads were harvested from BALB/c mice, washed in phosphate buffered saline (PBS), cut into small pieces with scissors and digested with a 1% solution of collagenase I (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS for 60 min at 37°C with gentle agitation. The cell suspension was washed in PBS and centrifuged (250 g, 8 min). The washing step was repeated 3 times. The pellet was resuspended and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, PAA Laboratories, Pasching, Austria) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Sigma), antibiotics (100 µg/ml of streptomycin, 100 U/ml of penicillin) and 10 mM Hepes buffer (hereinafter referred to as complete DMEM) in 75 cm² tissue culture flasks (Nunc, Roskilde, Denmark) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After a 48-h incubation, the nonadherent cells were removed by washing and the remaining adherent cells were cultured with regular exchange of the culture medium and passaging of the cells to maintain an optimal cell concentration. Cells between passage 3 and 5 were used.

Immunosuppressive Drugs

Cyclosporine (CsA), mycophenolate mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexamethasone (Dex) and prednisone (Pred) (all purchased from Sigma) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) in concentration 5 mg/ml and stored at –20°C. In each experiment a vehicle control was included. Corresponding concentration of DMSO had no effects on cell activities (data not shown).

Characterisation of MSCs by Flow Cytometry

MSCs were incubated without or with immunosuppressive drugs (CsA, MMF, Rapa, Pred and Dex at concentrations 5, 0.5, 0.05 and 0.005 µg/ml) for 48 h, washed in PBS containing 0.5% bovine serum albumine (BSA) and then incubated for 30 min on ice with the following anti-mouse monoclonal antibodies (mAb): allophycocyanine (APC)-labelled anti-CD44 (clone IM7, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled anti-CD90.2 (clone 30-H12, BioLegend, San Diego, CA, USA), phycoerythrin (PE)-labelled anti-CD105 (clone MJ/18, eBioscience, San Diego, CA, USA), APC-labelled anti-CD11b (clone M1/70, BioLegend), PE-labelled anti-CD31 (clone MEC 13.3, BD Pharmingen) or PE-labelled anti-CD45 (clone 30-F11, BioLegend). Dead cells were stained using Hoechst 33,258 fluorescent dye (Sigma) added to the samples 15 min before flow cytometry analysis. Data were collected using a LSRII cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) and analysed using Gatelologic 400.2A software (Invai, Mentone, Australia).

Determination of MSC Proliferation and Viability

The metabolic activity of living cells was determined by the WST assay. MSCs ($0.03 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated alone or with immunosuppressive drugs at a concentration of 5, 0.5, 0.05 and 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in a volume of 0.2 ml of complete DMEM in 96-well tissue culture plates (Corning Co., Corning, NY, USA) for 48 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . WST-1 reagent (Roche, Mannheim, Germany) (1:10 final dilution) was added to each well, and the plates were incubated for another 2 h to form formazan. The absorbance was measured using an ELx800 ELISA Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Germany) at a wavelength of 450 nm.

Regulation of Spleen Cell Proliferation

Spleen cells (0.75×10^6 cells/ml) were stimulated in a volume of 0.2 ml of RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% FCS, antibiotics (penicillin, streptomycin), 10 mM Hepes buffer and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (hereinafter a complete RPMI 1640 medium) in 72-well tissue culture plates (Corning) with Concanavaline A (ConA, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) and with immunosuppressive drugs at a concentration of 5; 0.5, 0.05 and 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cell proliferation was determined by adding ^3H -thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$, PE systems, Waltham, MA, USA) for the last 6 h of the 96-h incubation period.

Cytokine Production and Detection

To test the production of interleukin 2 (IL-2) and interferon γ ($\text{IFN}\gamma$), spleen cells ($1.25 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated in 48-well tissue culture plates (Nunc) in a final volume of 0.6 ml of complete RPMI 1640 medium stimulated with ConA (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 (IL-2) or 48 ($\text{IFN}\gamma$) h. To test the effect of immunosuppressive drugs on spleen cells, CsA, MMF, Rapa, Pred and Dex (5, 0.5, 0.05 and 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added to the cultures. The production of IL-2 and $\text{IFN}\gamma$ was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using cytokine-specific capture and detection mAbs purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) and following the manufacturer's instructions. The reactions were quantified by spectrophotometry using an ELx800 ELISA Reader.

Co-Cultures of MSCs and Lymphocytes

Spleen cells ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated in 24-well tissue culture plates (Nunc) in a final volume of 1 ml of complete RPMI 1640 medium stimulated with ConA (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 48 h (to determine apoptosis, T lymphocyte activation and intracellular detection of cytokines) or 72 h (for intracellular detection of ROR γ t, T-bet, Foxp3 and GATA-3). To test the

effect of MSCs in combination with immunosuppressive drugs on spleen cells, MSCs at the ratio 1:30 and CsA (0.05, 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$), MMF (0.5, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Rapa (0.05, 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Pred (0.5, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Dex (0.5, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added to the cultures.

Detection of Apoptosis

Spleen cells cultured for 48 h with MSCs and immunosuppressive drugs were harvested, washed in PBS containing 0.5% BSA and were incubated for 30 min on ice with FITC-labelled anti-CD3 mAb (clone 17A2, BioLegend), FITC-labelled anti-CD4 mAb (clone KG1.5, BioLegend), FITC-labelled anti-CD8a mAb (clone 53–6.7, BioLegend) and PE-labelled anti-CD45 mAb (clone 30-F11, BioLegend). After washing in PBS containing 0.5% BSA, cells were stained for Annexin V using an Annexin V apoptosis detection kit according to the manufacturer's protocol (Apronex, Jesenice, Czech Republic). Dead cells were discriminated using Hoechst 33258 fluorescent dye (Sigma) added to the samples 15 min before flow cytometry analysis. Data were collected using a LSRII cytometer (BD Bioscience) and analysed using Gatelologic 400.2A software (Invai).

Regulation of T Lymphocyte Activation

To test the effect of MSCs in combination with immunosuppressive drugs on T lymphocyte activation, the cultured spleen cells were harvested, washed in PBS containing 0.5% BSA and stained for 30 min on ice with FITC-labelled mAb anti-CD4 (clone GK1.5, BD Pharmingen), APC-labelled mAb anti-CD8a (clone 53–6.7, BioLegend), FITC-labelled mAb anti-CD25 (clone 3C7, BioLegend), APC-labelled mAb anti-CD25 (clone PC61, BioLegend) and PE-labelled mAb anti-CD45 (clone 30-F11, BioLegend). Dead cells were stained using Hoechst 33,258 fluorescent dye (Sigma) added to the samples 15 min before flow cytometry analysis. Data were collected using a LSRII cytometer (BD Bioscience) and analysed using Gatelologic 400.2A software (Invai, Mentone, Australia).

Intracellular Staining of ROR γ t, T-bet, GATA-3 and Foxp3

The cultured spleen cells were harvested and washed with PBS containing 0.5% BSA. Before intracellular staining cells were incubated for 30 min on ice with FITC-labelled mAb anti-CD4 (clone GK1.5, BD Pharmingen), Alexa Fluor 700-labelled mAb anti-CD45 (clone 30-F11, BioLegend) and Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for staining dead cells. Cells were washed in PBS containing 0.5% BSA, fixed and permeabilized using a Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience)

according to the manufacturer's instructions. For intracellular detection of ROR γ t, T-bet, GATA-3 and Foxp3, the cells were stained for 30 min with PE-labelled mAb anti-ROR γ t (clone AFKJS-9, eBioscience), APC-labelled mAb anti-T-bet (clone eBio4B10, eBioscience) PE-labelled mAb anti-GATA-3 (clone TWAJ, eBioscience) and PE-labelled mAb anti-Foxp3 (cloneFJK-16 s, eBioscience). Data were collected using a LSRII cytometer (BD Bioscience) and analysed using Gatelagic 400.2A software (Invai).

Intracellular Detection of IL-4, IL-10, IL-17 and IFN γ

To analyse the intracellular IL-4, IL-10, IL-17 and IFN γ expression, phorbol myristate acetate (PMA; 20 ng/ml, Sigma), ionomycin (1 μ g/ml, Sigma) and Brefeldin A (5 μ g/ml, eBioscience) were added to the cultures for the last 5 h of the 48-h incubation period. Cells were then harvested, washed with PBS containing 0.5% BSA and were incubated for 30 min on ice with FITC-labelled mAb anti-CD4 (clone GK1.5, BD Pharmingen), APC-labelled mAb anti-CD4 (clone GK1.5, BioLegend), APC-labelled mAb anti-CD8a (clone 53–6.7, BioLegend), Alexa Fluor 700-labelled mAb anti-CD45 (clone30-F11, BioLegend) and Live/Dead Fixable Violet Dead Stain Kit (Molecular Probes) for staining dead cells before intracellular staining. A Fixation and Permeabilization Kit (eBioscience) was used for permeabilization according to the manufacturer's instructions. The cells were intracellularly stained for 30 min with PE-labelled mAb anti-IL-4 (clone 11B11, eBioscience), APC-labelled mAb anti-IL-10 (clone JES5-16E3, eBioscience), PE-labelled mAb anti-IL-17 (clone eBio17B7, eBioscience) and FITC-labelled mAb anti-IFN γ (clone XMG1.2, eBioscience). Data were collected using a LSRII cytometer (BD Bioscience) and analysed using Gatelagic 400.2A software (Invai).

Statistical Analysis

The Prism 5 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis. The results are expressed as the mean \pm standard error (SE). The statistical significance of differences between the means of individual groups was calculated using one way analysis of variance (ANOVA). *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Immunosuppressive Drugs Affect the Metabolic Activity of MSCs but not their Surface Marker Expression

Adipose tissue-derived MSCs growing for 3 weeks in culture were phenotypically characterized by flow cytometry. As

demonstrated in Fig. 1a, untreated and immunosuppressive drug-treated MSCs were negative with a corresponding intensity for CD11b, CD31 and CD45 markers and were positive for CD44, CD90.2 and CD105, which are markers attributed to murine MSCs, in each concentration of immunosuppressive drugs used (only results for the highest used concentration of immunosuppressive drugs are shown). After culture expansion, MSCs showed a typical spindle-shaped fibroblastic morphology. Under appropriate culture conditions, both untreated and immunosuppressive drug-treated MSCs were able to differentiate into adipocytes or osteoblasts (data not shown).

To further characterise the effects of immunosuppressive drugs on MSCs, the cells were treated with increasing concentrations of CsA, MMF, Rapa, Pred and Dex and their proliferation and viability was determined by the WST assay. As demonstrated in Fig. 1b, MSCs are susceptible to Rapa and to the highest concentration of MMF. All the other samples had comparable metabolic activity.

Immunosuppressive Drugs Inhibit Spleen Cells Proliferation and Production of IL-2 and IFN γ in a Dose-Dependent Manner

To select the optimal concentrations of immunosuppressive drugs that inhibit lymphocyte activation, but not MSCs viability, the effect of used drugs on splenocyte proliferation was tested. As demonstrated in Fig. 2a, all tested drugs inhibited in a dose dependent manner proliferation of ConA-stimulated lymphocytes.

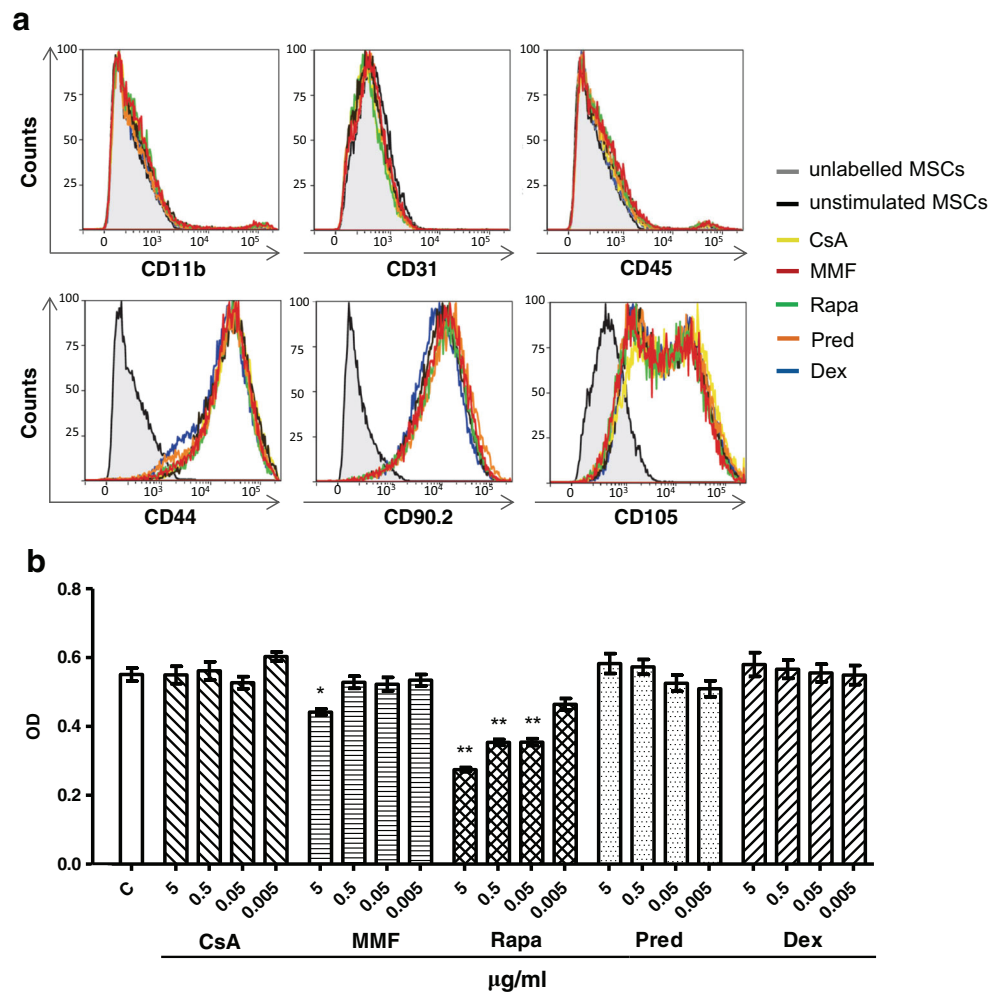
Next, we evaluated the effects of immunosuppressive drugs on the production of IL-2 (Fig. 2b) and IFN γ (Fig. 2c), by ConA stimulated splenocytes. Similar to the effect observed for proliferation, the highest concentrations of immunosuppressants significantly inhibited the production of these cytokines, while at the lowest concentration, the capacity to produce IL-2 and IFN γ was partially restored.

On the basis of the above results from dose-response assays for MSCs and splenocytes, two concentrations (CsA 0.5 and 0.005, MMF 0.5 and 0.05, Rapa 0.05 and 0.005, Pred 0.5 and 0.05, Dex 0.5 and 0.05 μ g/ml) of each immunosuppressant were selected for following experiments.

MSCs Improve T Lymphocytes Viability

The effect of immunosuppressants and their combination with MSCs on CD3⁺ T cell apoptosis was tested by Annexin V staining. The presence of Annexin V⁺ Hoechst 33258⁻ (apoptotic) and Annexin V⁺ Hoechst 33258⁺ (dead) cells increased after treatment with all immunosuppressive drugs (Fig. 3a). A higher percentage of apoptotic cells was observed

Fig. 1 The effect of immunosuppressive drugs on the phenotype and metabolic activity of MSCs. Flow cytometry analysis did not show significant changes in the expression of CD11b, CD31, CD44, CD45, CD90.2 and CD105 MSCs treated with CsA, MMF, Rapa, Pred and Dex in comparison with untreated MSCs (a). One representative of 3 independent experiments is presented. The metabolic activity of untreated or immunosuppressive drug treated MSCs was evaluated by WST assay (b). Data are expressed as the means \pm SE from five independent experiments. Groups with asterisks are significantly different (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) from control (untreated MSCs, C)



in samples treated with CsA, Pred and Dex. However, this effect of immunosuppressants on T lymphocyte viability was partially moderated by MSCs. Accordingly with this observation, the proportion of live lymphocytes significantly increased in samples treated with MSCs. The changes in apoptosis induction are similar for both CD4⁺ (Fig. 3b) and CD8⁺ (Fig. 3c) lymphocytes.

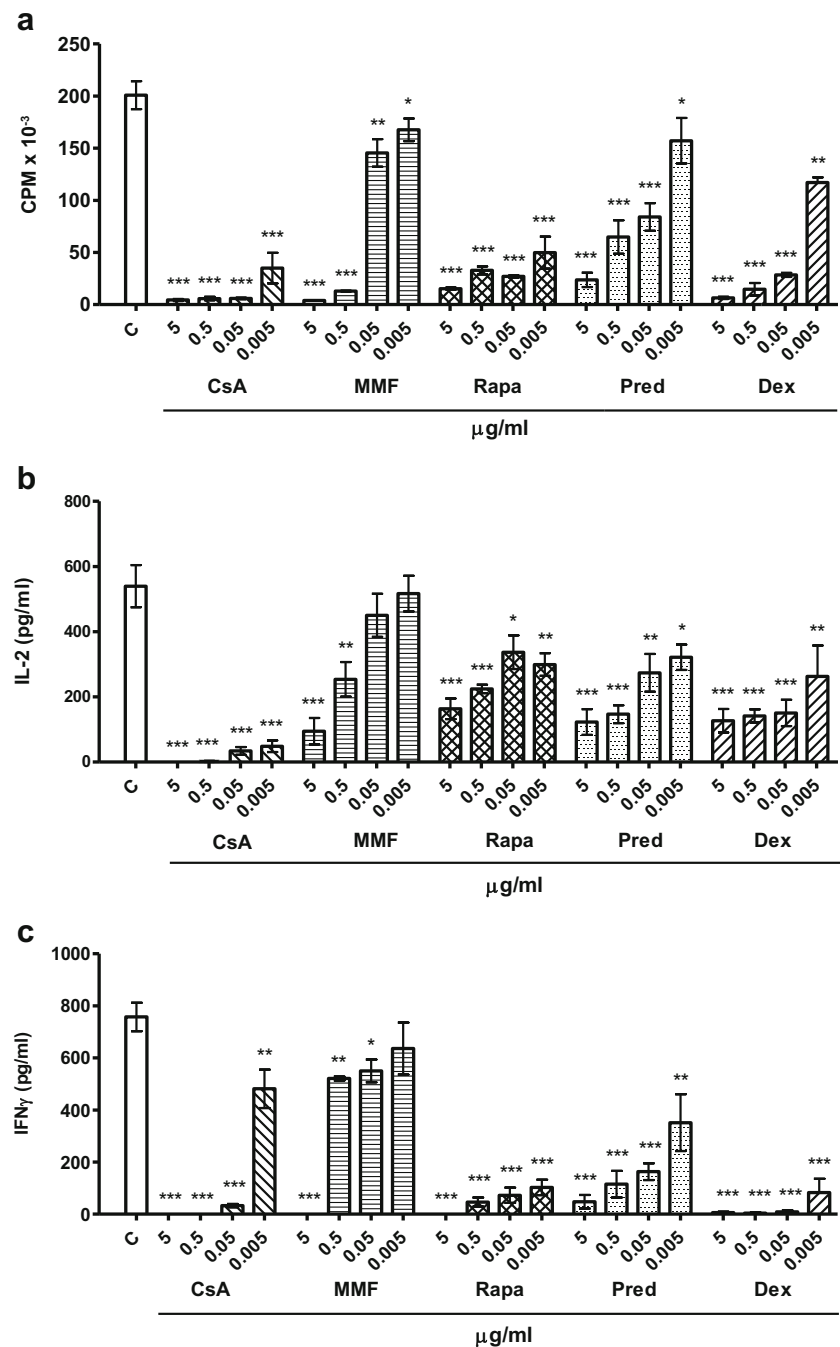
MSCs Downregulate CD25 Expression on Immunosuppressive Drug Treated T Lymphocytes

MSCs were tested for their capability to inhibit activation of ConA-stimulated spleen cells. Spleen cells were stimulated with ConA and cultured for 48 h in the presence or absence of MSCs and immunosuppressive drugs and the percentage of activated (CD25⁺) T cells was determined. As shown in Fig. 4a, MSCs suppressed activation of CD4⁺ lymphocytes with the greatest decline in groups treated with Pred and Dex (Fig. 4a). This effect was even more pronounced on CD8⁺ lymphocyte activation (Fig. 4b).

MSCs in Combination with Immunosuppressive Drugs Regulate the ROR γ t, T-bet, GATA-3 and Foxp3 Expression

To further analyse the effect of the treatment on individual T cell populations, splenocytes were stimulated for 72 h with ConA in the presence or absence of MSCs and immunosuppressive drugs and the percentage of CD4⁺ROR γ t⁺ (Th17), CD4⁺T-bet⁺ (Th1) CD4⁺GATA-3⁺ (Th2) and CD4⁺Foxp3⁺ (Treg) cells was determined. As demonstrated in Fig. 5a, MSCs significantly suppressed ROR γ t expression in the majority of treated groups. This effect was most evident in groups treated with 0.05 $\mu\text{g/ml}$ MMF, Pred and Dex, where the drug alone did not decrease the percentage of Th17 cells. The immunosuppressants, with the exception of MMF, significantly decreased T-bet expression, as in case of ROR γ t, the presence of MSCs in cultures further downregulated the percentage of T-bet positive cells in all samples (Fig. 5b). Figure 5c demonstrates, that the presence of MSCs in the cultures containing immunosuppressants significantly decreased the proportion of CD4⁺GATA-3⁺ cells in all groups. As shown in Fig. 5d, the

Fig. 2 Immunosuppressive drugs modulate T lymphocytes activity in a dose-dependent manner. Spleen cells were stimulated with ConA in the absence or presence of immunosuppressive drugs and the lymphocytes proliferation was determined after a 72-h incubation (a). Production of IL-2 (b) and IFN γ (c) by spleen cells stimulated with ConA and treated with immunosuppressants was determined by ELISA after a 24-h (IL-2) or 48-h (IFN γ) incubation. Data are expressed as the means \pm SE from five independent experiments. Groups with asterisks are significantly different (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) from control (untreated splenocytes, C)



proportion of CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells was augmented in the presence of MSCs. The most apparent increase in the number of Foxp3⁺ cells was observed in groups treated with MSCs in combination with CsA, Rapa and Dex.

MSCs in Combination with Immunosuppressants Modulate IL-4, IL-10, IL-17 and IFN- γ Production

To provide direct evidence that MSCs in combination with immunosuppressive drugs also modulate the functions of different T cells populations, spleen cells were stimulated with

ConA for 48 h in the presence or absence of immunosuppressive drugs and MSCs. The intracellular level of cytokines specific for individual T cell subsets (IL-17, IFN γ , IL-4 and IL-10 in CD4⁺ cells and IFN- γ in CD8⁺ cells) were determined. As shown in Fig. 6a, treatment with immunosuppressants did not significantly attenuate the proportion of CD4⁺IL-17⁺ cells, rather, we observed upregulation in samples treated with Pred and Dex. However, MSCs completely abrogated this effect and significantly downregulate the expression of IL-17 in the presence of all tested drugs. As shown in Fig. 6b, the percentage of CD4⁺IFN γ ⁺ cells significantly

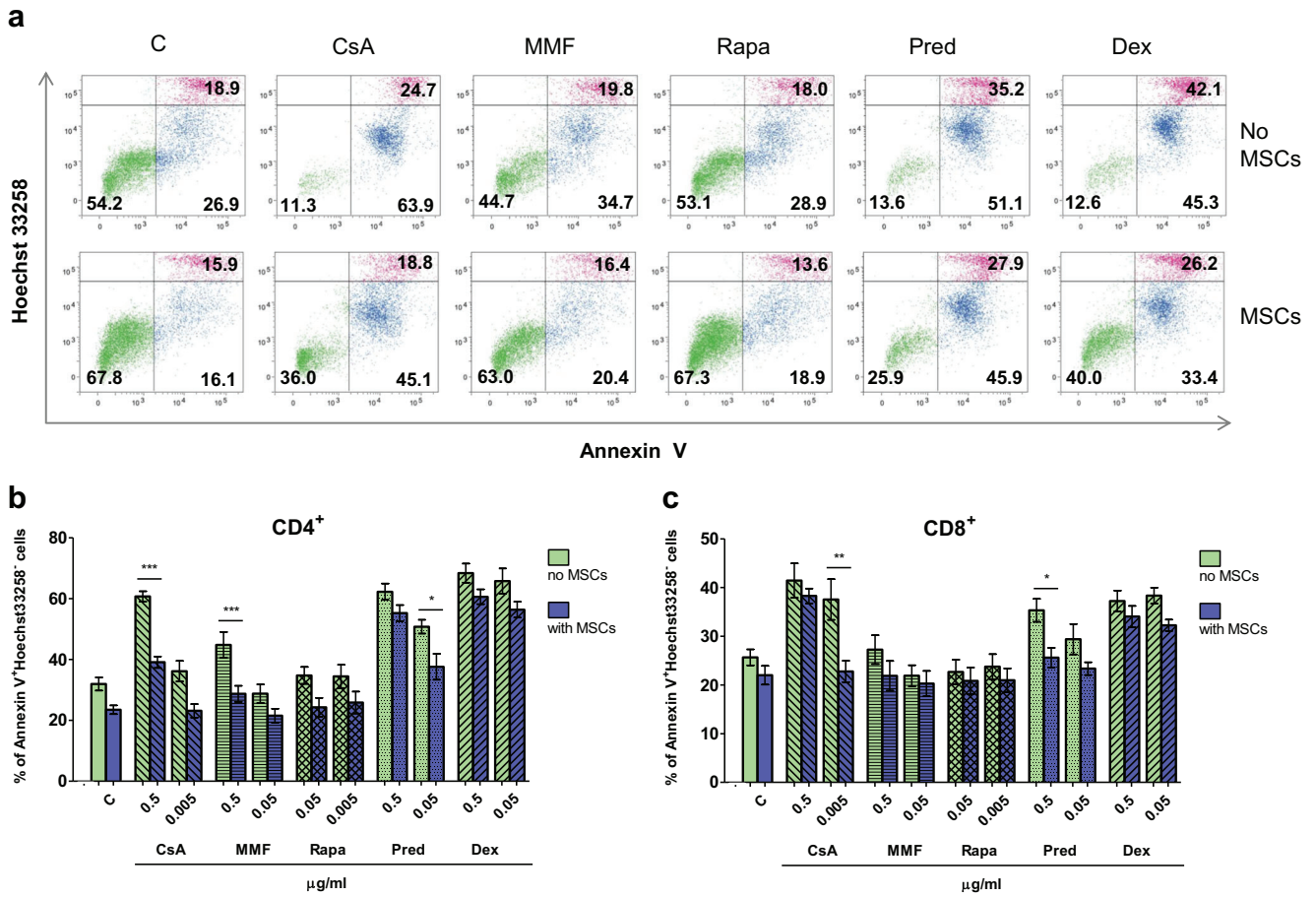


Fig. 3 The effect of immunosuppressive drugs and MSCs on splenocyte viability. Splenocytes were stimulated with ConA in the absence or presence of MSCs and immunosuppressive drugs for 48 h. The number of live (Annexin V⁻Hoechst 33258⁺), apoptotic (Annexin V⁺Hoechst 33258⁺) and dead (Hoechst 33,258⁺Annexin V⁺) CD3⁺ T cells was determined by flow cytometry

(a). One representative of 3 independent experiments is presented. The effects of immunosuppressive drugs on CD4⁺ (b) and CD8⁺ (c) cells were further studied. Data are expressed as the means ± SE from five independent experiments. Statistical significance between groups is marked with asterisks (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001), (untreated cells, C)

decreased after treatment with the majority of used drugs and this effect was more evident in the presence of MSCs. We observed downregulation of the CD4⁺IL-4⁺ population in the presence of the majority of drugs with an even more apparent decrease in the groups treated with MSCs (Fig. 6c). Figure 6d demonstrates that similar to CD4⁺IFNγ⁺ cells, the frequency of the CD8⁺IFNγ⁺ cells was significantly suppressed in the presence of MSCs. In contrast, the percentage of CD4⁺IL-10⁺ cells stayed similar in all groups with the tendency of upregulation observed in cultures treated with MMF or Dex in combination with MSCs. (Fig. 6e).

Discussion

In several pathological conditions the suppression of harmful immune reaction is the main issue. Treatment combining transplantation of MSCs with immunosuppressive drug application ranks among the very promising new therapeutic

strategies aiming to reduce immunosuppressant doses, eliminate their adverse effects and to improve their action. Although the suppressive effects of MSCs cultured in combination with different immunosuppressants on T lymphocyte proliferation have been described [15, 16], a limited knowledge is available about modulatory action on the individual T-cell subsets. Our study was specifically designed to examine the interactions between MSCs and immunosuppressive drugs in vitro and to determine how such treatment modulated the balance among individual T lymphocyte subpopulations and whether it affected their function.

Untreated or drug-treated MSCs showed no significant changes in the expression of the surface markers associated with murine MSCs (CD44, CD90.2 and CD105) after cultivation with tested immunosuppressants. However, high concentrations of MMF and Rapa significantly downregulate MSC proliferation and viability. A similar observation has been reported by Hoogdujien et al. [16], who tested the effect of Tacrolimus, MMF and Rapa on human MSC proliferation.

Fig. 4 The effect of MSCs and immunosuppressive drugs on the expression of activation marker CD25 on T cells. Spleen cells were stimulated with ConA in the absence or presence of MSCs and immunosuppressive drugs for 48 h. Flow cytometry analysis showed that MSCs downregulate the percentage of CD4⁺CD25⁺ (a) as well as CD8⁺CD25⁺ (b) cells. Data are expressed as the means ± SE from five independent experiments. Statistical significance between groups is marked with asterisks (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001), (untreated cells, C)

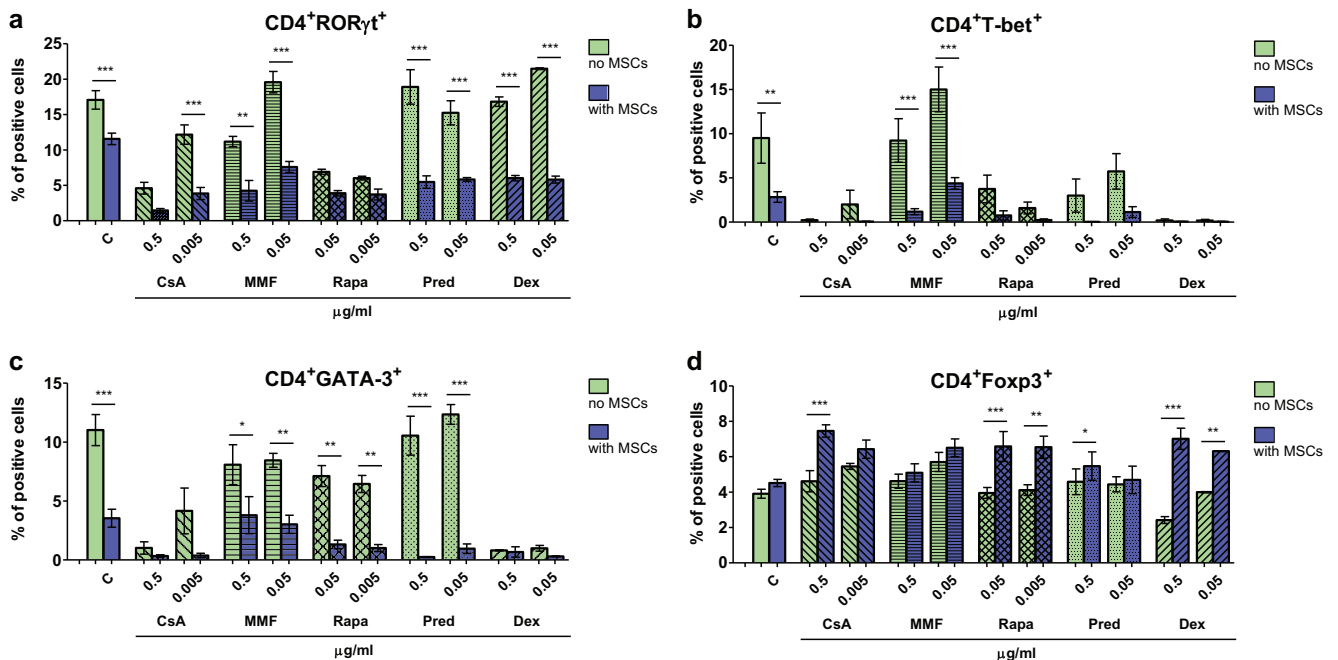
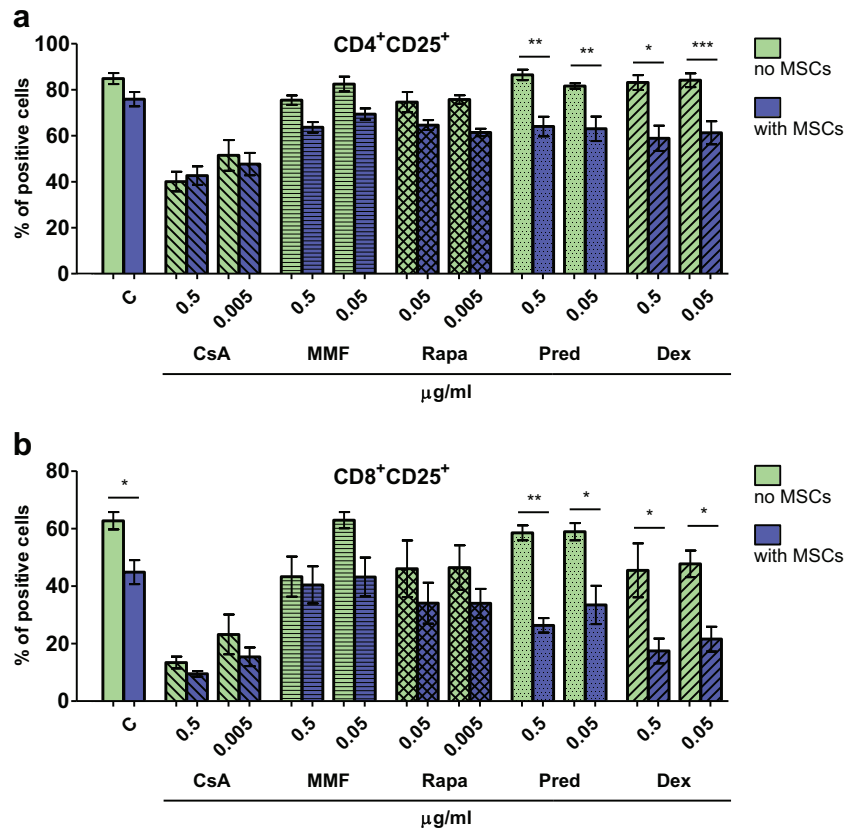


Fig. 5 Regulation of RORγt, T-bet, Foxp3 and GATA-3 expression by immunosuppressive drugs and MSCs. Spleen cells were stimulated with ConA in the absence or presence of MSCs and immunosuppressive drugs for 72 h and analysed using flow cytometry. The treatment reduces the percentage of CD4⁺RORγt⁺ (a), CD4⁺T-bet⁺ (b) and CD4⁺GATA-3⁺ (c)

populations in all groups. On the contrary, the proportion of CD4⁺Foxp3⁺ Treg (d) was slightly upregulated. Data are expressed as the means ± SE from five independent experiments. Statistical significance between groups is marked with asterisks (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001), (untreated cells, C)

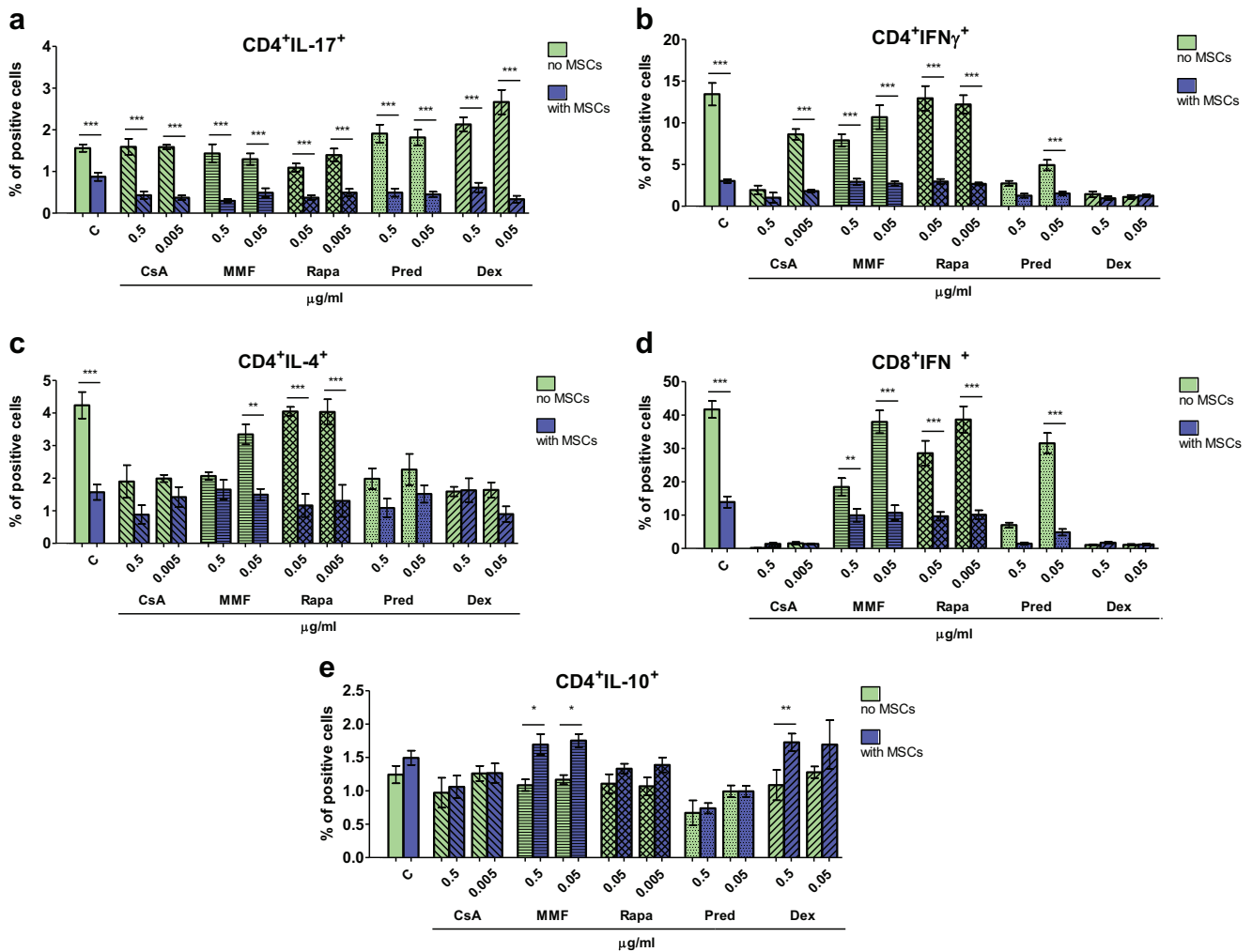


Fig. 6 The effect of MSCs and immunosuppressive drugs on IL-17, IFN- γ , IL-10 and IL-4 producing cells. Spleen cells were stimulated for 48 h with ConA in the absence or presence of immunosuppressive drugs and MSCs. The flow cytometry analysis showed a significant downregulation of the proportion of CD4⁺IL-17⁺ (a), CD4⁺IFN- γ ⁺ (b), CD4⁺IL-4⁺ (c)

and CD8⁺IFN- γ ⁺ (d) cells. In addition the preservation or upregulation of CD4⁺IL-10⁺ (e) cells was observed. Data are expressed as the means \pm SE from five independent experiments. Statistical significance between groups is marked with asterisks (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001), (untreated cells, C)

To select the optimal concentrations of drugs for the further study, we performed a dose-response tests, and the concentrations which significantly suppressed T lymphocyte functions, but did not decrease viability of MSCs, were used for further experiments.

Induction of apoptosis is a key mechanism to delete activated T cells in the periphery during the termination of an immune response [27], but subsequent deficits of immune cells can lead to the development of opportunistic infections or malignancies [28]. Our results showed that the treatment of spleen cells with immunosuppressive drugs increases the proportion of apoptotic and dead CD3⁺ T cells and at the same time decreases the percentage of living cells in the culture. It has been described that MSCs inhibit the spontaneous death of lymphocytes [29] and are able to inhibit proliferation of activated T cells while simultaneously supporting their survival

[30, 31]. We found that the presence of MSCs in cultures partially rescued cells from the apoptotic pathway induced by immunosuppressants. Furthermore our results showed that the above mentioned effects are similar for both CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations.

MSCs possess the ability to inhibit the expression of activation marker CD25 on Th and Tc lymphocytes [32] and our results demonstrated that this downregulation could be further intensified by the presence of immunosuppressants. Taken together, it appears that although MSCs rescued CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes from apoptosis caused by immunosuppressive agents, they promoted the inhibitory action of immunosuppressants by reducing the proportion of cells with activated phenotype.

So far, dysregulation of composition of various T cell subpopulations and their related cytokines has been proposed to

play a crucial role as an inflammation-promoting mechanism in autoimmune diseases or transplantation reaction [33, 34]. It has been well documented that MSCs possess the ability to modulate this balance [5, 6, 35]. Our results demonstrated that treatment combining MSCs and immunosuppressants significantly decreased the proportion of CD4⁺RORγt⁺ Th17 cells as well as the percentage of the IL-17⁺ cells and thus the functional properties of these cells. Moreover, we found a synergistic effect of immunosuppressive agents and MSCs. Intriguingly, Pred and Dex showed a tendency to upregulate RORγt and IL-17 expression. These findings confirmed the observation of Prado et al. [36], who pointed out that glucocorticoids rather activated Th17 cells and caused Th17/Th1 imbalance in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). On the other hand MMF inhibits Th17 related immune response [37] and thus MMF is considered a suitable drug for use in transplantation medicine [19, 38]. However, our results have shown that lower concentrations of MMF slightly upregulated RORγt expression. These inconsistent results might be due to differences in the drug metabolism in vivo and in an in vitro systems. Nevertheless, the stimulatory effect of both MMF and glucocorticoids on Th17 cells was completely abrogated by MSCs and the expression of RORγt and IL-17 was significantly decreased in the presence of MSCs. As with Th17 cells, the percentage of CD4⁺T-bet⁺ cells was decreased in the presence of immunosuppressive agents with the exception of MMF. However, also in this group the expression of T-bet cells was decreased in the presence of MSCs. We observed a significant decrease in the percentage of both CD4⁺IFNγ⁺ and CD8⁺IFNγ⁺ populations after co-culture with MSCs with the most significant suppression in the CsA- and Dex-treated groups.

It has been shown that depending on specific conditions during the development and progression of different diseases, MSCs are able to either promote [39] or downregulate [40] Th2 related immune response. In the present study, we observed that MSCs had the ability to suppress both GATA-3 and IL-4 expression in all immunosuppressive drug treated samples. This might be beneficial especially in the treatment of Th2 mediated inflammatory diseases, such as allergic asthma or SLE. In contrast to the downregulation of Th17, Th1, Th2 and Tc cells, MSCs in combination with immunosuppressive agents increased the Treg proportion in all samples. Furthermore, we showed that MSCs promoted IL-10 expression and thus supported the regulatory function of CD4⁺ cells. A significant increase of the CD4⁺IL-10⁺ population was observed in cultures combining treatment with MMF or a higher concentration of Dex with MSCs. Interestingly, we found that the changes in the expression of transcription factors of distinct T lymphocytes populations did not correlate with the changes in production of population related cytokines. These differences might be due to ability of immunosuppressive drugs to inhibit T lymphocyte proliferation but at the same

time maintain their activity [41]. Moreover, it has been suggested by Prado et al. that upregulation of transcription factor expression in T cells after treatment is not necessarily associated with the increase of their cytokine production [36].

The presence of immunosuppressive drugs with different mechanisms of the action modulates the cytokine environment in the culture, which subsequently interacts with MSCs and affect their immunomodulatory action. Furthermore it has been shown that distinct T lymphocyte population display different sensitivity to immunosuppressive drugs [32, 42, 43] and individual drugs also interact with different molecular target in MSCs [16].

This study sheds new light on several reports indicating that MSCs in combination with immunosuppressive agents might be useful in preventing harmful immune response. We have shown that MSCs modulate the effect of immunosuppressive drugs and that therapy combining immunosuppressive agents with MSCs could favourably influence immune balance by harnessing the Th17/Th1/Th2/Tc related responses while preserving the anti-inflammatory Treg phenotype. In addition, these data clearly demonstrated that MSCs are also able to reverse the undesirable effects of immunosuppressive drugs such as the upregulation of the Th17 related response. Our data also underscored that the observed therapeutic benefits are not simply a result of the additive effects of MSCs and drugs, but that the interactions between MSCs, individual immunosuppressive drugs and the immune system are very complex. Understanding these mechanisms is essential for translation of MSCs in combination with immunosuppressive drugs into clinical practice.

Acknowledgements This study was supported by grant 80815 from the Grant Agency of Charles University, the grant 14-12580S, and by the projects SVV 260310, UNCE 204013, NPU-I:LO1508 and NPU-I:LO1309 and P41-20504151.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Dobbels, F., Moons, P., Abraham, I., et al. (2008). Measuring symptom experience of side-effects of immunosuppressive drugs: the modified transplant symptom occurrence and distress scale. *Transplant International*, 21, 764–773.
2. Hoogduijn, M. J., Crop, M. J., Peeters, A. M. A., et al. (2007). Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells and Development*, 16, 597–604.
3. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klueter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone

- marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 1294–1301.
4. Kong, Q.-F., Sun, B., Bai, S., et al. (2009). Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF- β . *Journal of Neuroimmunology*, 207, 83–91.
 5. Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., et al. (2012). 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.
 6. Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 1815–1822.
 7. Haynesworth, S. E., Baber, M. A., & Caplan, A. I. (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 α . *Journal of Cellular Physiology*, 166, 585–592.
 8. Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K. K., et al. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8932–8937.
 9. Javorkova, E., Trosan, P., Zajicova, A., Krulova, M., Hajkova, M., & Holan, V. (2014). Modulation of the early inflammatory micro-environment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon-gamma-treated mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Development*, 23, 2490–2500.
 10. Gu, Y., Xue, Q., Chen, Y.-J., et al. (2013). Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Human Immunology*, 74, 267–276.
 11. Kim, S.-Y., Lee, J.-H., Kim, H. J., et al. (2012). Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302, L891–L908.
 12. Ciccocioppo, R., Bernardo, M. E., Sgarella, A., et al. (2011). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*, 60, 788–798.
 13. Casiraghi, F., Azzollini, N., Cassis, P., et al. (2008). Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 181, 3933–3946.
 14. Cejkova, J., Trosan, P., Cejka, C., et al. (2013). Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Experimental Eye Research*, 116, 312–323.
 15. Buron, F., Perrin, H., Malcus, C., et al. (2009). Human mesenchymal stem cells and immunosuppressive drug interactions in allogeneic responses: an in vitro study using human cells. *Transplantation Proceedings*, 41, 3347–3352.
 16. Hoogduijn, M. J., Crop, M. J., Korevaar, S. S., et al. (2008). Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation*, 86, 1283–1291.
 17. Chen, T. L., Wang, J. A., Shi, H., et al. (2008). Cyclosporin A preincubation attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 68, 585–593.
 18. Popp, F. C., Eggenhofer, E., Renner, P., et al. (2008). Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transplant Immunology*, 20, 55–60.
 19. Eggenhofer, E., Renner, P., Soeder, Y., et al. (2011). Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transplant Immunology*, 25, 141–147.
 20. Ge, W., Jiang, J., Baroja, M. L., et al. (2009). Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *American Journal of Transplantation*, 9, 1760–1772.
 21. Wang, H., Qi, F., Dai, X., et al. (2014). Requirement of B7-H1 in mesenchymal stem cells for immune tolerance to cardiac allografts in combination therapy with rapamycin. *Transplant Immunology*, 31, 65–74.
 22. Hajkova, M., Javorkova, J., Zajicova, A., et al. (2015). A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in a macrophage phenotype. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term.2044.
 23. Li, J.-F., Zhang, D.-J., Geng, T., et al. (2014). The potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Cell Transplantation*, 23, S113–S122.
 24. Peng, Y., Ke, M., Xu, L., et al. (2013). Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation*, 95, 161–168.
 25. Perico, N., Casiraghi, F., Inrona, M., et al. (2011). Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 412–422.
 26. Fanigliulo, D., Lazzarini, P. E., Capecci, P. L., Ulivieri, C., Baldari, C. T., & Laghi-Pasini, F. (2015). Clinically-relevant cyclosporin and rapamycin concentrations enhance regulatory T cell function to a similar extent but with different mechanisms: an in-vitro study in healthy humans. *International Immunopharmacology*, 24, 276–284.
 27. Kawabe, Y., & Ochi, A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺CD4⁺ T-cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin. *Nature*, 349, 245–248.
 28. Crowe, S. M., Carlin, J. B., Stewart, K. I., Lucas, C. R., & Hoy, J. F. (1991). Predictive value of lymphocyte-CD4 numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 4, 770–776.
 29. Xu, G., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, G., & Shi, Y. (2007). The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, 745–750.
 30. Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., et al. (2007). Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 25, 1753–1760.
 31. Normanton, M., Alvarenga, H., Hamerschlak, N., et al. (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.
 32. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Gotherstrom, C., et al. (2004). Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60, 307–315.
 33. Talaat, R. M., Mohamed, S. F., Bassyouni, I. H., & Raouf, A. A. (2015). Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: correlation with disease activity. *Cytokine*, 72, 146–153.
 34. Ma, L., Zhang, H. M., Hu, K. B., et al. (2015). The imbalance between Tregs, Th17 cells and inflammatory cytokines among renal transplant recipients. *BMC Immunology*, 16. doi:10.1186/s12865-015-0118-8.
 35. Mohammadzadeh, A., Pourfathollah, A. A., Shahrokhi, S., Hashemi, S. M., Moradi, S. L. A., & Soleimani, M. (2014). Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem

- cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets. *International Immunopharmacology*, 20, 316–321.
36. Prado, C., de Paz, B., Gomez, J., Lopez, P., Rodriguez-Carrio, J., & Suarez, A. (2011). Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology*, 50, 1794–1801.
 37. Abadja, F., Atemkeng, S., Alamartine, E., Berthoux, F., & Mariat, C. (2011). Impact of mycophenolic acid and tacrolimus on Th17-related immune response. *Transplantation*, 92, 396–403.
 38. Weigel, G., Griesmacher, A., Karimi, A., Zuckermann, A. O., Grimm, M., & Mueller, M. M. (2002). Effect of mycophenolate mofetil therapy on lymphocyte activation in heart transplant recipients. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 21, 1074–1079.
 39. Chang, J. W., Hung, S. P., Wu, H. H., et al. (2011). Therapeutic effects of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental lupus nephritis. *Cell Transplantation*, 20, 245–257.
 40. Goodwin, M., Sueblinvong, V., Eisenhauer, P., et al. (2011). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem Cells*, 29, 1137–1148.
 41. Miroux, C., Morales, O., Ouaguia, L., et al. (2012). Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil. *Transplantation Proceedings*, 44, 2834–2839.
 42. Rovira, J., Renner, P., Sabet-Baktach, M., et al. (2016). Cyclosporine A inhibits the T-bet-dependent antitumor response of CD8+ T cells. *American Journal of Transplantation*, 16, 1139–1147.
 43. Lemaitre, P. H., Vokaer, B., Charbonnier, L. M., et al. (2013). Cyclosporine A drives a Th17-and Th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *American Journal of Transplantation*, 13, 611–620.

5.3 Modulace časného zánětlivého mikroprostředí v poškozeném oku pomocí systémově podaných MSCs stimulovaných IFN- γ

Eliška Javorková, Peter Trošan, Alena Zajícová, Magdaléna Krulová, **Michaela Hájková** a Vladimír Holáň

Stem Cells Dev. 2014: 23, 2490-2500

Cílem této studie bylo sledovat efekty systémově podaných MSCs izolovaných z kostní dřeně na časnou fázi akutního zánětu v oku poškozeném hydroxidem sodným. Myši s poškozeným okem byly ponechány neléčené, nebo jim 24 hodin po poranění byly intravenózně podány fluorescenčně značené MSCs, které byly nestimulované, nebo ovlivněné IL-1 α , TGF- β , nebo IFN- γ . Po třech dnech od poškození jsme prokázali, že MSCs migrují specificky do poškozeného oka a že počet značených MSCs je 30krát větší v poškozeném než v kontrolním oku. Studium složení populace leukocytů v poškozených očích ukázala, že všechny typy testovaných MSCs mírně snižují počet lymfoidních i myeloidních infiltrujících buněk, ale pouze MSCs preinkubované s IFN- γ významně redukovaly procento buněk infiltrujících do oka, přičemž největší efekt byl pozorován u myeloidních buněk. Tato studie ukázala, že systémově aplikované MSCs migrují specificky do poškozeného oka a že MSCs ovlivněné IFN- γ jsou nejúčinnější ve snižování infiltrace leukocytů do oka, významně snižují produkci NO, IL-1 α a IL-6 a potlačují akutní fázi zánětu.

Můj podíl na publikaci: experimentální část (příprava kryožezů), analýza a interpretace výsledků

Modulation of the Early Inflammatory Microenvironment in the Alkali-Burned Eye by Systemically Administered Interferon- γ -Treated Mesenchymal Stromal Cells

Eliska Javorkova,^{1,2} Peter Trosan,^{1,2} Alena Zajicova,¹ Magdalena Krulova,^{1,2}
Michaela Hajkova,² and Vladimir Holan^{1,2}

The aim of this study was to investigate the effects of systemically administered bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) on the early acute phase of inflammation in the alkali-burned eye. Mice with damaged eyes were either untreated or treated 24 h after the injury with an intravenous administration of fluorescent-dye-labeled MSCs that were unstimulated or pretreated with interleukin-1 α (IL-1 α), transforming growth factor- β (TGF- β), or interferon- γ (IFN- γ). Analysis of cell suspensions prepared from the eyes of treated mice on day 3 after the alkali burn revealed that MSCs specifically migrated to the damaged eye and that the number of labeled MSCs was more than 30-times higher in damaged eyes compared with control eyes. The study of the composition of the leukocyte populations within the damaged eyes showed that all types of tested MSCs slightly decreased the number of infiltrating lymphoid and myeloid cells, but only MSCs pretreated with IFN- γ significantly decreased the percentage of eye-infiltrating cells with a more profound effect on myeloid cells. Determining cytokine and NO production in the damaged eyes confirmed that the most effective immunomodulation was achieved with MSCs pretreated with IFN- γ , which significantly decreased the levels of the proinflammatory molecules IL-1 α , IL-6, and NO. Taken together, the results show that systemically administered MSCs specifically migrate to the damaged eye and that IFN- γ -pretreated MSCs are superior in inhibiting the acute phase of inflammation, decreasing leukocyte infiltration, and attenuating the early inflammatory environment.

Introduction

ACHEMICAL BURN OF THE EYE causes severe inflammation, corneal opacity, neovascularization, and epithelial defects, which can finally lead to a permanent loss of vision. A massive infiltration of inflammatory cells can be detected in the site of injury already 24 h after corneal damage. The number of infiltrating macrophages is amplified several fold within 36 h, and this increase is accompanied by a rising lymphocyte infiltration [1]. The conventional treatment protocols of the acute phase of corneal inflammation consist of inhibiting the inflammatory reaction and neovascularization by immunosuppressive drugs, but novel therapeutic strategies involving the transplantation of corneal epithelial sheets or limbal stem cells cultured on an appropriate carrier have been developed and successfully applied [2–5].

More recently, mesenchymal stromal cells (MSCs) have been suggested and tested as a promising therapeutic tool for the treatment of many disorders involving corneal defects. These cells have the potential to differentiate into various

cell types [6], including epithelial cells [7–9], and thus they have been used for ocular surface reconstruction. Moreover, MSCs possess potent immunomodulatory properties and can influence various functions of immune cells, including dendritic cells, naive and effector T lymphocytes, and natural killer (NK) cells [10]. The immunomodulatory properties of MSCs have been documented in numerous *in vitro* and *in vivo* studies that demonstrate the ability of MSCs to prolong allograft survival [11,12], ameliorate experimental autoimmune disorders [13], or attenuate severe acute graft-versus-host disease [14].

The beneficial effects of MSCs consist not only in their ability to replace injured cells, but also in their modulation of the local proinflammatory microenvironment by the production of numerous immunomodulatory and trophic factors. It has been shown that the curative effect of MSCs on corneal injury can consist partly in the epithelial transdifferentiation of MSCs [7,15] and in the suppression of corneal inflammation [16–19].

This study was focused on monitoring and evaluating the effects of systemically administered MSCs on the early

¹Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.

²Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic.

acute phase of inflammation in the alkali-burned eye using an experimental murine model. Since the immunomodulatory properties of MSCs can be modified by proinflammatory cytokines [20–22], we compared the effect of unstimulated MSCs and MSCs pretreated with interleukin (IL)-1 α , interferon (IFN)- γ , or transforming growth factor (TGF)- β on the inflammatory environment in the eye.

Materials and Methods

Mice

Female BALB/c mice at the age of 8–12 weeks were obtained from the breeding unit of the Institute of Molecular Genetics (Prague, Czech Republic). The use of animals was approved by the local Animal Ethics Committee.

Isolation, culture, and purification of MSCs

Bone marrow for the cultivation of MSCs was isolated from the femurs and tibias of female BALB/c mice. The bone marrow was flushed out, a single-cell suspension was prepared using a tissue homogenizer, and the cells were seeded at a concentration of 2×10^6 cells/mL in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO) containing 10% fetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Grand Island, NY), antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 μ g/mL of streptomycin), and 10 mM HEPES buffer (hereafter referred to as complete DMEM) in 75-cm² tissue culture flasks (TPP, Trasadingen, Switzerland). Nonadherent cells were washed out after 72 h of cultivation, and the remaining adherent cells were cultured for an additional 3 weeks (two passages) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Plastic-adherent cells were harvested by incubating the cells with 8 mL of 10 mM EDTA for 5 min and subsequent gentle scraping. The resulting cell suspension was incubated for 15 min with CD11b MicroBeads and CD45 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cell suspension was then immunodepleted of CD11b⁺ and CD45⁺ contaminating cells using a magnetic activated cell sorter (AutoMACS; Miltenyi Biotec). The remaining CD11b⁻ and CD45⁻ cells were evaluated in terms of their purity and differentiation potential.

Phenotypic characterization of MSCs by flow cytometry

Unstimulated and cytokine-pretreated MSCs were washed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and then incubated for 30 min on ice with the following anti-mouse monoclonal antibodies (mAbs): allophycocyanine (APC)-labeled anti-CD44 (clone IM7; BD PharMingen, San Jose, CA), phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD105 (clone MJ7/18; eBioscience, San Diego, CA), APC-labeled anti-CD11b (clone M1/70; BioLegend, San Diego, CA), or fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD45 (clone 30-F11; BioLegend). Dead cells were stained using Hoechst 33258 fluorescent dye (Invitrogen, Carlsbad, CA) added to the samples 10 min before flow cytometry analysis. Data were collected using an LSRII cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Labeling of MSCs with PKH26 fluorescent dye

MSCs were labeled with a fluorescent dye (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit; Sigma) in order to monitor their fate after intravenous administration. MSCs were labeled according to the manufacturer's instructions with modifications introduced in the protocol to achieve optimal labeling for this type of cells. Particularly, a final concentration of 2 μ M of PKH26 for 1×10^6 MSCs/mL and a 5-min incubation were determined to be the optimal conditions. The fluorescence intensity and homogeneity of the staining were tested by fluorescent microscopy (Inverted fluorescent microscope Olympus IX71, Center Valley, PA) and flow cytometry.

A model of corneal damage

Female BALB/c mice were deeply anesthetized by an intramuscular injection of a mixture of xylazine and ketamine (Rometa, Spofa, Prague, Czech Republic). The surface (corneal and limbal region) of the left eye was damaged by the application of 3-mm-diameter filter paper soaked with 8 μ L of 1 N NaOH for 30 s. The eye was then thoroughly rinsed with 10 mL of PBS.

In vitro stimulation and the intravenous administration of MSCs

MSCs were labeled with PKH26 dye and incubated at a concentration of 0.5×10^6 cells/mL in a volume of 1.5 mL of complete DMEM in a 12-well tissue culture plate (Nunc, Roskilde, Denmark) for 24 h. MSCs were cultured either unstimulated or were pretreated with 10 ng/mL of mouse recombinant IL-1 α (Immunotools, Friesoyte, Germany), 10 ng/mL of IFN- γ (Immunotools), or 2 ng/mL of human TGF- β (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Stimulated MSCs were then harvested and centrifuged in an excess of serum-free DMEM in order to remove the rest of the serum and added cytokines. For intravenous application, 0.5×10^6 MSCs were resuspended in 200 μ L of serum-free DMEM. The cell suspension was administered to mice through the tail vein using a 30G Omnican 100 syringe (B. Braun, Melsungen, Germany) 24 h after corneal damage.

Preparation of single-cell suspension from the eye and other organs

Single-cell suspensions from the whole eyeballs of both damaged and control eyes were prepared for flow cytometry analysis and cell culturing. The eyeballs were cleaned of redundant tissue, cut into pieces, and centrifuged in 600 μ L of HBSS to obtain a tissue extract for ELISA analysis. The pelleted tissue was then digested with 1 mg/mL of collagenase I (Sigma) in HBSS for 50 min at 37°C. To monitor the fate of PKH26-labeled MSCs after their intravenous administration, selected tissues and organs were obtained and digested to prepare single-cell suspensions for flow cytometry. Eyes, lung, and liver were digested in 1 mg/mL of collagenase I in HBSS for 50 min at 37°C. Lymph nodes (inguinal, brachial, cervical, and submandibular) and spleen were digested in 1 mg/mL of collagenase II (Sigma) in HBSS for 60 min at 37°C. A cell suspension from the bone marrow was prepared in the same way as in the protocol for the culture of MSCs.

Monitoring the migration of PKH26-labeled MSCs in the body

To determine the distribution of PKH26-labeled MSCs in the body 48 h after their intravenous administration, single-cell suspensions were prepared from several tissues and organs (eyes, lung, liver, spleen, lymph nodes, and bone marrow). For flow cytometry analysis, the concentration of the cells was adjusted to $1 \times 10^6/\text{mL}$ in PBS containing 0.5% BSA. The number of PKH26-labeled cells was determined using an LSRII cytometer, and the data were analyzed by FlowJo software. To determine more precise location of PKH26⁺ cells in damaged eye, single-cell suspensions were prepared from anterior segment, vitreous humor, and posterior segment of damaged eyes from mice treated with unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ . The cell suspensions were incubated with APC-labeled anti-CD44 mAb (BD PharMingen, San Jose, CA) and a total number of PKH26⁺CD44⁺ MSCs in particular segments was assessed by flow cytometry.

Immunofluorescent staining of frozen sections of damaged eyes

For frozen sectioning, damaged eyes of mice that were untreated or were treated with unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ were enucleated and immersion fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, followed by overnight cryoprotection in 15% sucrose. The eyes were embedded in optical cutting temperature medium and frozen sections at a thickness of 7 μm were prepared using a Leica CM 3050 cryostat (Leica, Wetzlar, Germany). The sections were refixed by 4% paraformaldehyde for 10 min, washed in PBS, blocked by 10% BSA in PBS containing 0.5% Triton X-100 for 30 min, and then incubated with APC-labeled anti-CD45 mAb (clone 30-F11; BioLegend) in blocking solution for 2 h at room temperature. After washing three times with PBS, slides were mounted with DAPI (Vectashield; Vector Labs, Burlingame, CA). CD45⁺ leukocyte and PKH26⁺ MSC infiltration were analyzed using fluorescent microscope Olympus Cell-R.

Detection of gene expression by real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from unstimulated and cytokine-pretreated MSCs using TRI Reagent (Molecular Research

Center, Cincinnati, OH) according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was treated with deoxyribonuclease I (Promega, Madison, WI) and used for subsequent reverse transcription. The first-strand cDNA was synthesized using random hexamers (Promega) in a total reaction volume of 25 μL using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed in a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) as we have previously described [23,24]. The sequences of primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), IL-6, TGF- β , indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), hepatocyte growth factor (HGF), and cyclooxygenase 2 (COX2) used for amplification are presented in Table 1. The PCR parameters included denaturation at 95°C for 3 min, 40 cycles at 95°C for 20 s, annealing at 60°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s. Fluorescence data were collected at each cycle after an elongation step at 80°C for 5 s and were analyzed using StepOne Software version 2.2.2 (Applied Biosystems).

Samples for testing changes in the expression of genes for cytokines and iNOS in control and damaged eyes were prepared from fresh single-cell suspensions (IL-6) or obtained after culturing suspensions for 48 h (IL-1 α , IL-10, or iNOS). In brief, cells ($1 \times 10^6/\text{mL}$) from control and damaged eyes were cultured in a volume of 800 μL of RPMI 1640 medium (Sigma) containing 10% FCS (Gibco BRL), antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin), and 10 mM HEPES buffer (hereafter referred to as complete RPMI) in 48-well tissue culture plates (Corning, Corning, NY) in the presence of 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of concanavalin A (ConA; Sigma) and 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lipopolysaccharide (LPS; Difco Laboratories, Detroit, MI) for a 48-h incubation period. The sequences of primers for GAPDH, IL-1 α , IL-6, IL-10, and iNOS used for amplification are shown in Table 1.

Flow cytometry characterization of leukocyte populations infiltrating the damaged eyes

Single-cell suspensions prepared from control and damaged eyes were washed in PBS containing 0.5% BSA and incubated for 30 min on ice with the following anti-mouse mAb (all purchased from BioLegend): peridin-chlorophyll protein/Cyanine5.5 (PerCP/Cy5.5)-labeled anti-CD45 (clone 30-F11), APC-labeled anti-CD3 (clone 17A2), FITC-labeled

TABLE 1. MURINE PRIMER SEQUENCES USED FOR REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Gene	Sense primer	Antisense primer
GAPDH	AGAACATCATCCCTGCATCC	ACATTGGGGGTAGGAACAC
IL-6	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
TGF- β	TGGAGCAACATGTGGAACCTC	CAGCAGCCGGTTACCAAG
IDO	GGGCTTTGCTCTACCACATC	AAGGACCCAGGGGCTGTAT
iNOS	CTTTGCCACGGACGAGAC	TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC
HGF	CACCCCTTGGGAGTATTGTG	GGGACATCAGTCTCATTACAG
COX2	AGCCACCCCAAACACAGT	AAATATGATCTGGATGTGACACATATT
IL-1 α	TTGGTTAAATGACCTGCAACA	GAGCGCTCACGAACAGTTG
IL-10	ATTTGAATTCCCTGGGTGAGAAG	CACAGGGGAGAAATCGATGACA

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; TGF- β , transforming growth factor- β ; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; HGF, hepatocyte growth factor; COX2, cyclooxygenase 2.

anti-CD4 (clone GK1.5), PE-labeled anti-CD8a (clone 53-6.7), PE-labeled anti-F4/80 (clone BM8), APC-labeled anti-CD80 (clone 16-10A1), PE-labeled anti-CD14 (clone Sa14-2), APC-labeled anti-CD11b (clone M1/70), FITC-labeled anti-Ly6G/Ly-6C (Gr-1) (clone RB6-8C5), and FITC-labeled anti-CD19 (clone 6D5). Dead cells were stained using Hoechst 33258 fluorescent dye (Invitrogen) added to the samples 10 min before flow cytometry analysis. Data were collected using an LSRII cytometer and analyzed using FlowJo software. One hundred thousand events from each sample were measured. These events were gated for CD45⁺ leukocytes after the exclusion of cell debris and dead cells and analyzed for particular markers.

Cytokine and NO measurement

Cytokines and NO were measured in tissue extracts and culture supernatants from control and damaged eyes. Tissue extracts were obtained during the preparation of single-cell suspensions from eyeballs. Supernatants were obtained after culturing cell suspensions from control and damaged eyes. Cells (1×10^6 /mL) were cultured in a volume of 800 μ L of complete RPMI medium (Sigma) in the presence of 1.5 μ g/mL of ConA and 1.5 μ g/mL of LPS for a 48-h incubation period. The production of IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, and IFN- γ was quantified by ELISA. The production of IL-2, IFN- γ , and IL-6 was measured using cytokine-specific capture and detection of mAbs purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, and

IL-17 were measured using ELISA kits purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Only IL-1 α , IL-6, and IL-10 were produced in significant concentrations and with enhanced production in the damaged eyes. The concentrations of NO in the supernatants were determined using the Griess reaction [25]. A mixture of 50 μ L of 1% sulfanilamide and 50 μ L of 0.3% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (both in 3% H₃PO₄) was incubated with 100 μ L of the tested supernatant. Nitrite was quantified by spectrophotometry at 540 nm using sodium nitrite as a standard.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between individual groups was calculated using the Student's *t*-test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Characterization of MSCs

The purity and phenotypic markers of MACS-separated MSCs pretreated with cytokines were assessed with flow cytometry. The results showed that unstimulated and cytokine-treated MSCs were positive with a corresponding intensity for CD44 and CD105, which are the markers attributed to murine MSCs (Fig. 1A). On the other hand, <1% of the cells were CD11b⁺ and <3% were CD45⁺ (Fig. 1A); therefore, the population of bone marrow cells

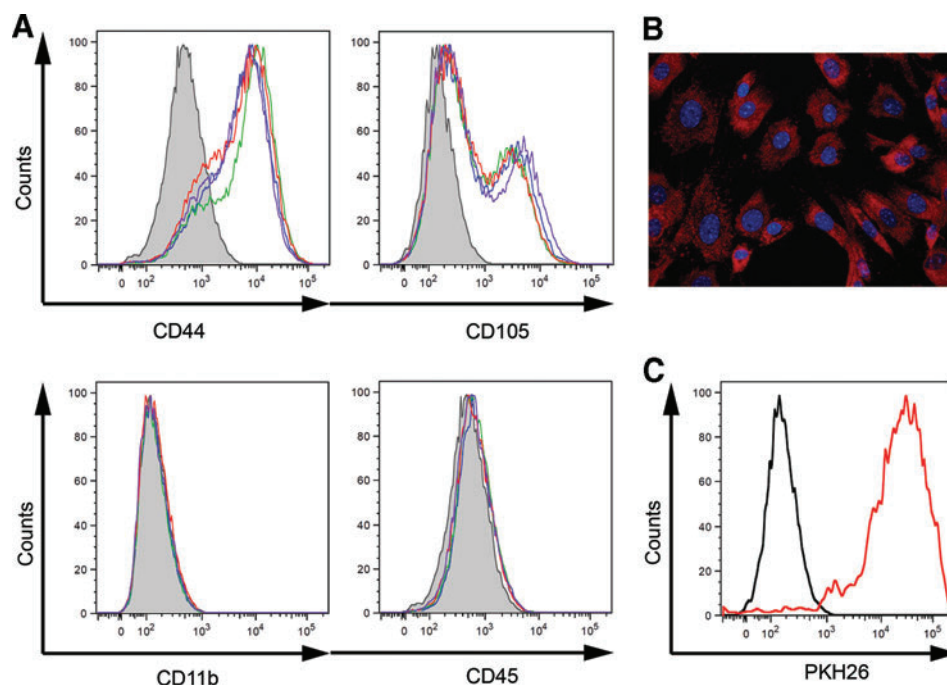


FIG. 1. Characterization of unstimulated mesenchymal stromal cells (MSCs) and MSCs pretreated with interleukin-1 α (IL-1 α), transforming growth factor- β (TGF- β), or interferon- γ (IFN- γ). (A) Flow cytometry analysis of CD44, CD105, CD11b, and CD45 markers expressed by unstimulated MSCs (blue curve) and MSCs pretreated with IL-1 α (green curve), TGF- β (red curve), or IFN- γ (violet curve) in comparison with control unlabeled MSCs (gray-tinted curve). One of 3 similar experiments is shown. (B) Representative image of MSCs labeled with PKH26 fluorescent dye (red cell membranes) and maintained for 24 h in culture. The nuclei are blue (DAPI staining); original magnification is 400 \times . (C) Using flow cytometry, the fluorescence intensity of PKH26-labeled MSCs was analyzed after 24 h in culture (red curve) in comparison to control unlabeled MSCs (black curve). One of 3 similar experiments is shown. Color images available online at www.liebertpub.com/scd

was depleted of contaminating CD11b⁺ and CD45⁺ cells with a high efficiency. In addition, both unstimulated and cytokine-treated MSCs were able to undergo adipogenic and osteogenic differentiation (data not shown). Further, PKH26-labeled MSCs possessed a sufficient, detectable, and relatively homogenous fluorescent signal that could be detected using a fluorescent microscopy and flow cytometry even after cultivation (Fig. 1B, C).

Real-time PCR analysis of the expression of genes for immunomodulatory molecules was performed for further characterization of unstimulated MSCs and MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ . As shown in Fig. 2, both unstimulated and pretreated MSCs expressed significant but variable levels of genes for TGF- β , HGF, and COX2. Moreover, MSCs pretreated with IL-1 α and IFN- γ expressed a significant level of mRNA for iNOS. Only MSCs pretreated with IL-1 α expressed the *IL-6* gene and, on the other hand, only MSCs pretreated with IFN- γ expressed the *IDO* gene (Fig. 2).

Monitoring of the distribution of PKH26-labeled MSCs in the body

The distribution of PKH26⁺ MSCs in the body 48 h after their systemic administration and possible differences in the migration of unstimulated and cytokine-pretreated MSCs were assessed using flow cytometry. Single-cell suspensions from the eye, lung, liver, and spleen; the inguinal, brachial, cervical, and submandibular lymph nodes; and the bone marrow were analyzed. A low number of PKH26⁺ MSCs was detected in the lymph nodes, while higher numbers of

PKH26⁺ cells migrated to the spleen and bone marrow and the highest number of labeled MSCs was trapped in the lung and liver (data not shown). The analysis of suspensions prepared from damaged and control eyes showed that both unstimulated and cytokine-pretreated MSCs migrated preferentially into the damaged eye and that the number of PKH26⁺ MSCs was more than 30-times higher in the damaged eye compared with the control eye (Fig. 3A). No significant differences were revealed between the migratory properties of unstimulated MSCs and MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ (Fig. 3B). Flow cytometry analysis of single-cell suspensions from anterior segment, vitreous humor, and posterior segment of damaged eyes from mice treated with unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ revealed that ~20% of PKH26⁺ CD44⁺ cells detected in eye was present in anterior segment, 10% of labeled cells was detected in vitreous humor, and 70% of cells was present in posterior segment of the damaged eye (Fig. 3B).

Determination of leukocyte populations infiltrating damaged eyes after treatment with MSCs

Since both unstimulated and cytokine-pretreated MSCs preferentially migrated to the damaged eye, the potential effect of MSCs on the local environment was tested in the next experiments. Cell suspensions from control and damaged eyes from untreated mice or mice treated with systemically administered MSCs were labeled with selected combinations of mAbs and analyzed by flow cytometry. To test the lymphoid lineages, the percentage of CD3⁺CD4⁺

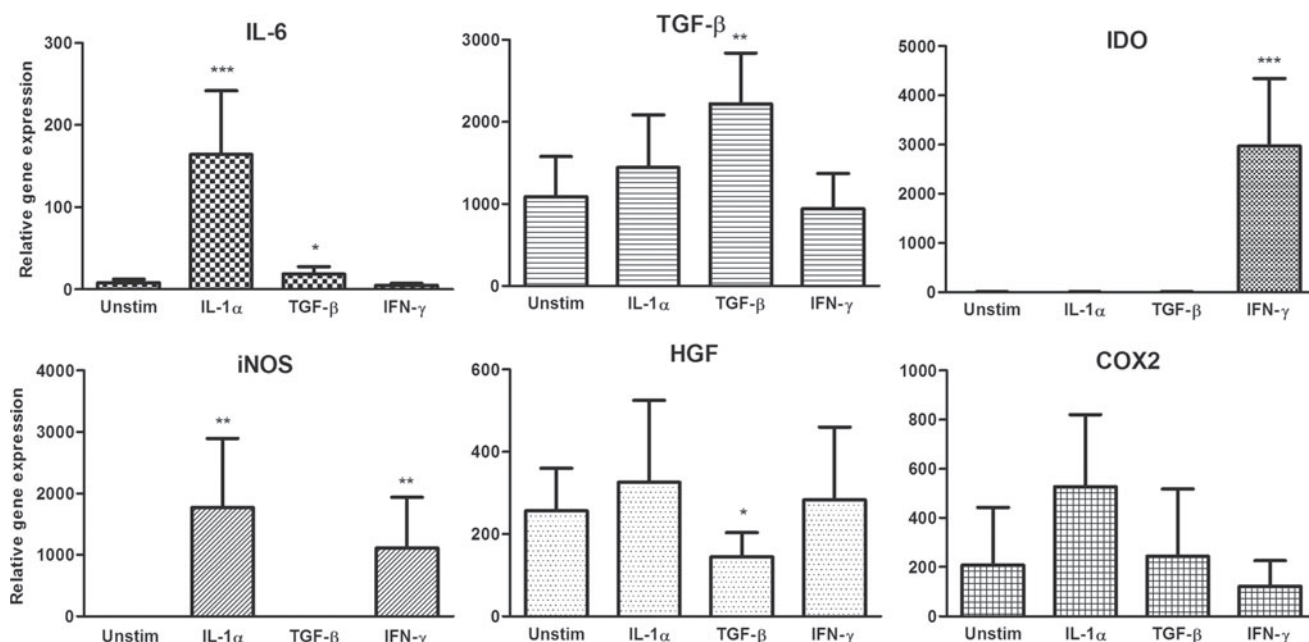


FIG. 2. Expression profile of genes for immunomodulatory molecules in unstimulated MSCs and MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ . MSCs were cultured for 24 h unstimulated or were pretreated with 10 ng/mL of IL-1 α or IFN- γ or 2 ng/mL of TGF- β . The expression of genes for IL-6, TGF- β , indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), hepatocyte growth factor (HGF), and cyclooxygenase 2 (COX2) was detected by real-time PCR. Values with asterisks are significantly different (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001) from the control value (unstimulated MSCs). Each bar represents the mean \pm SD from six independent experiments.

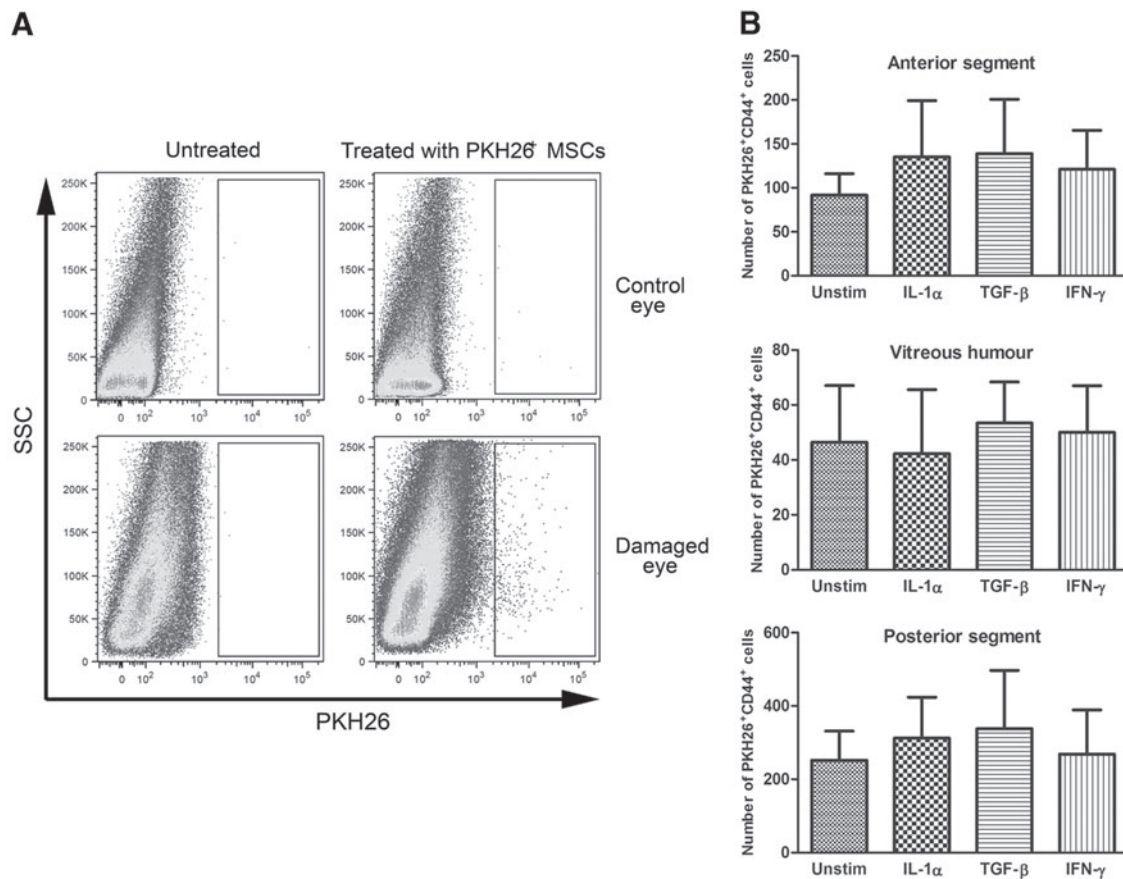


FIG. 3. Monitoring of the migration of PKH26-labeled MSCs into damaged and control eyes. **(A)** Representative dot plots showing flow cytometry analysis of single-cell suspensions prepared from control eyes and damaged eyes from untreated mice and mice treated with unstimulated MSCs (MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ showed a similar pattern of distribution.). A total of 200,000 events were analyzed after the exclusion of cell debris and dead cells, and these events were gated for PKH26⁺. **(B)** Flow cytometry analysis of number of PKH26⁺CD44⁺ MSCs in anterior segment, vitreous humor, and posterior segment of damaged eyes from mice treated with unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ . Each bar represents the mean \pm SD from five independent experiments.

(T lymphocytes and NK-T cells), CD3⁺CD8⁺ (T lymphocytes and NK-T cells), and CD19⁺CD22⁺ (B lymphocytes) cells was monitored. Figure 4 shows that the presence of all of the tested types of MSCs slightly decreased the percentage of damaged-eye-infiltrating lymphoid populations, but only MSCs pretreated with IFN- γ decreased the number of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, and CD19⁺CD22⁺ cells significantly. The effect of MSCs on the myeloid lineage was tested by assessing the percentage of infiltrating CD80⁺, CD14⁺, F4/80⁺, and CD11b⁺Gr-1⁺ (granulocytes and macrophages) cells. As demonstrated in Fig. 4, both unstimulated and cytokine-treated MSCs slightly decreased the percentages of CD80⁺ and CD11b⁺Gr-1⁺ cells, but only MSCs pretreated with IFN- γ significantly decreased the percentages of all myeloid populations, while MSCs pretreated with TGF- β significantly decreased the percentage of CD11b⁺Gr-1⁺ cells. In general, the effect of IFN- γ -pretreated MSCs was more profound on myeloid than lymphoid populations.

Microscopical analysis of frozen sections of damaged eyes confirmed the results from flow cytometry. As demonstrated in Figure 5, a strong infiltration with CD45⁺

leukocytes was observed in damaged eyes from untreated mice, and this infiltration was decreased in eyes from mice treated with MSCs.

Effect of MSCs on cytokine and NO production in control and damaged eyes

The flow cytometry data showed a significantly decreased infiltration of both lymphoid and myeloid cells in damaged eyes from mice injected with IFN- γ -pretreated MSCs. To extend this observation, we determined the production of the proinflammatory cytokines IL-1 α and IL-6 and the secretion of NO in damaged eyes from mice treated with unstimulated or cytokine-pretreated MSCs. As demonstrated in Figure 6, systemic treatment with IFN- γ -primed MSCs significantly inhibited the local production of IL-1 α , IL-6, and NO in the damaged eye. In contrast, the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was not inhibited by MSCs (Fig. 6). These results were confirmed by real-time PCR analysis. The expression of genes for IL-1 α and IL-6 in the damaged eyes of mice injected with IFN- γ -pretreated

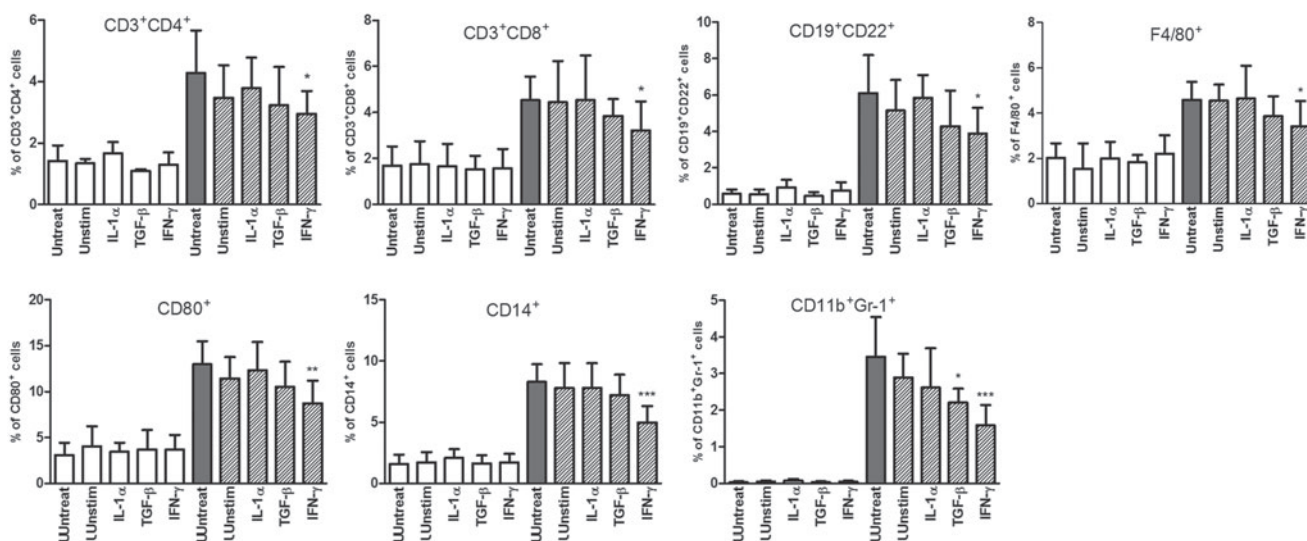


FIG. 4. Flow cytometry analysis of leukocyte populations infiltrating control (*white columns*) and damaged (*dashed and gray columns*) eyes of untreated mice and mice treated with the systemic administration of unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ (in the graphs labeled as Unstim, IL-1 α , TGF- β , and IFN- γ). One hundred thousand events from each sample were measured. These events were gated for CD45⁺ leukocytes after the exclusion of cell debris and dead cells and analyzed for the percentage of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺CD22⁺, CD80⁺, CD14⁺, F4/80⁺, or CD11b⁺Gr-1⁺ cells. Values with *asterisks* are significantly different (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) from the control values (damaged eyes of untreated mice). Each bar represents the mean \pm SD from 10 independent experiments.

MSCs was significantly inhibited. Similarly, the expression of the gene for iNOS was significantly decreased in mice treated with IFN- γ -pretreated MSCs. In agreement with the results from ELISA, the expression of the *IL-10* gene was not inhibited by MSCs (Fig. 7).

Discussion

The present study was designed to evaluate the effects of MSCs on immunological processes occurring in the eye in the early period after the ocular surface damage. We focused

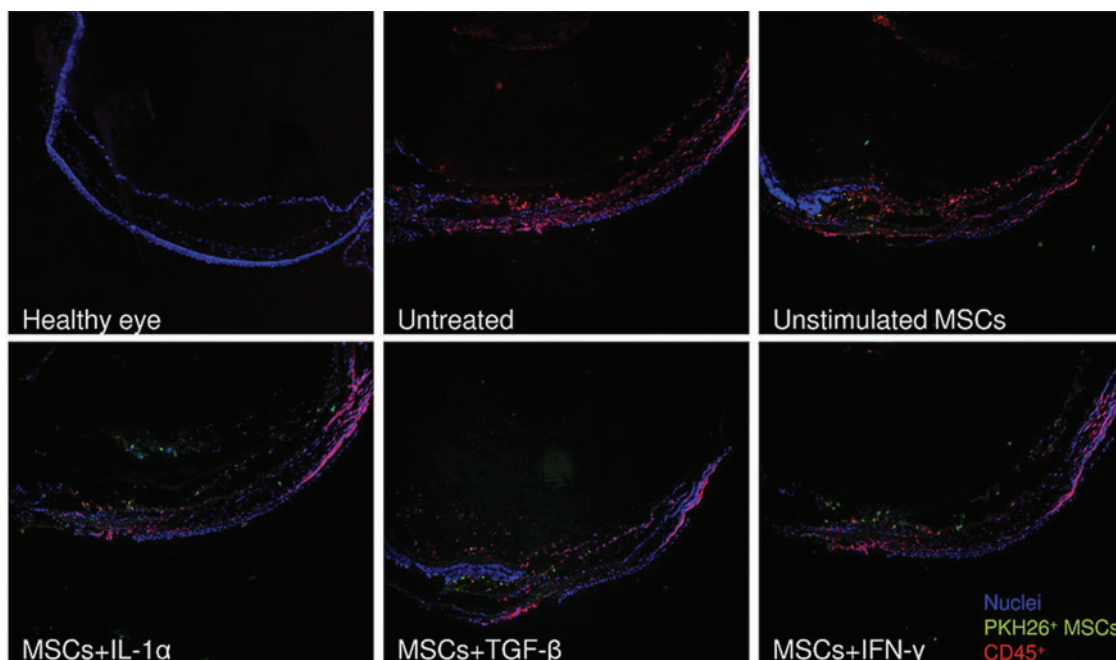


FIG. 5. Immunofluorescent staining of frozen sections of eyes from untreated mice and mice treated with unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ . Representative pictures show part of anterior segment (*right upper part of image*) and lateral segment of control healthy eye and damaged eye from untreated mouse and from mouse treated with unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ . The infiltration of the eye with MSCs labeled with PKH26 fluorescent dye (*green*) and CD45⁺ leukocytes (*red*) is shown. The nuclei are *blue* (DAPI staining); original magnification is 40 \times . Color images available online at www.liebertpub.com/scd

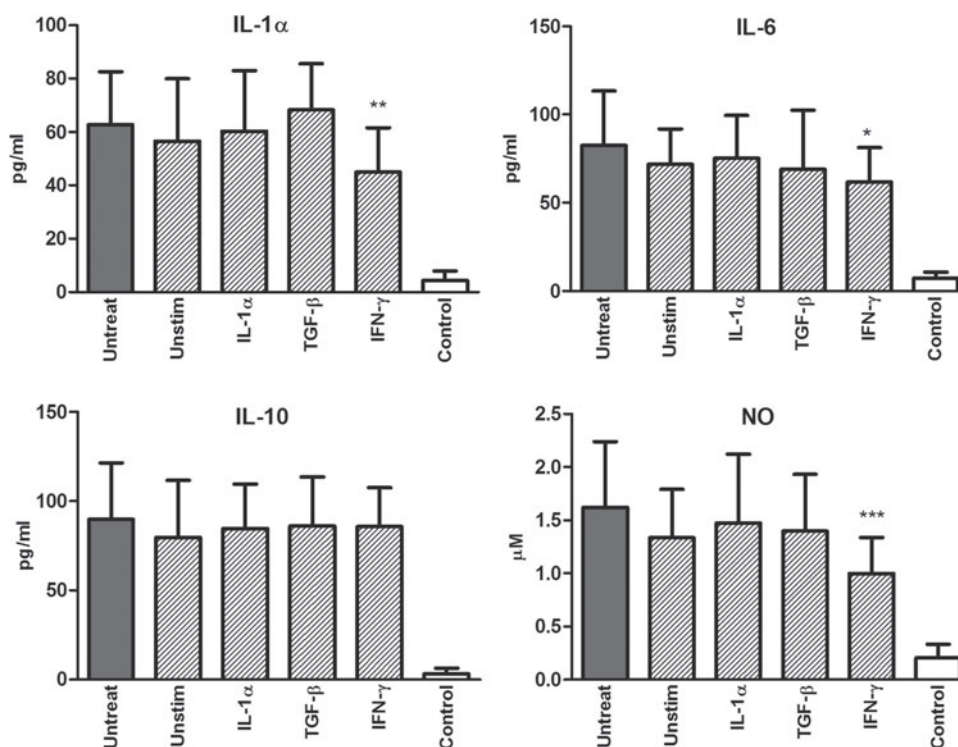


FIG. 6. The effect of MSCs on cytokine and NO production. Cytokine and NO production in control (*white column*) and damaged (*dashed and gray columns*) eyes of untreated mice and mice treated with the systemic administration of unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ (in the graphs labeled as Unstim, IL-1 α , TGF- β , and IFN- γ). The level of IL-6 was measured by ELISA in tissue extracts obtained from freshly isolated eyes. The production of IL-1 α and IL-10 was determined by ELISA in supernatants from cultures of control and damaged eyes after stimulation with concanavalin A (ConA; 1.5 μ g/mL) and lipopolysaccharide (LPS; 1.5 μ g/mL) for 48 h. The production of NO was measured in culture supernatants using the Griess reaction. Values with *asterisks* are significantly different (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) from the control values (damaged eyes of untreated mice). Each bar represents the mean \pm SD from 12 independent experiments.

on the eye infiltration by different leukocyte populations and on the local cytokine microenvironment, but not on characterization of the eye surface regeneration, which occurs in the later phase after ocular surface damage. Majority of published studies investigated the effects of MSCs on the ocular surface regeneration, but not on immunological processes occurring in the eye within the first 3 days after ocular damage.

Since previous studies have demonstrated that cytokines can modulate the immunoregulatory properties of MSCs [20–22], we compared the therapeutic effects of unstimulated MSCs and MSCs pretreated with IL-1 α , IFN- γ , or TGF- β . MSCs were administered intravenously 24 h after corneal damage, at the time when the number of eye-infiltrating myeloid and lymphoid cells markedly increases. The immunomodulatory effects of MSCs were evaluated 72 h after the injury.

Initially, we tested the expression of cell surface markers and the migratory properties of unstimulated and cytokine-pretreated MSCs. These cells were positive for CD44 and CD105 and no significant differences in the intensity of expression of the tested markers were detected. A similar conclusion was reached by Najjar et al. [20], who tested a panel of endothelial, stromal, and adhesive markers in unstimulated MSCs and MSCs stimulated with a cocktail of proinflammatory cytokines; no differences were detected. In

addition, we did not find any variation in the migration of unstimulated and cytokine-pretreated MSCs, and a comparable distribution of injected MSCs was detected within the tested organs and tissues. In another study, Hemeda et al. [26] assessed the effect of IFN- γ and TNF- α on MSCs, and TNF- α was recognized as the predominant regulator of MSC migration. On the other hand, pretreatment of MSCs with IFN- γ increased their migration to the inflamed intestine in an animal model of colitis [27].

Our results confirmed that systemically administered MSCs are able to specifically migrate to the damaged eye. We found a more than 30-times higher number of injected MSCs in the damaged eye compared with the control contralateral eye. These findings are in agreement with the observation of Lan et al. [28], who detected systemically administered MSCs on day 3 in the cauterized cornea but not in the contralateral cornea. Systemically administered MSCs were also detected in the cornea 14 days after their injection in a rabbit eye alkali-burn model [29] but not in the case of xenogeneic (human) MSCs administered systemically in order to heal a corneal injury in the rat [19].

Since both unstimulated and cytokine-pretreated MSCs preferentially migrated into the injured eye, we tested the effects of the engrafted MSCs on the infiltration of the damaged eye by populations of lymphoid and myeloid cells. All types of MSCs slightly decreased infiltration by the

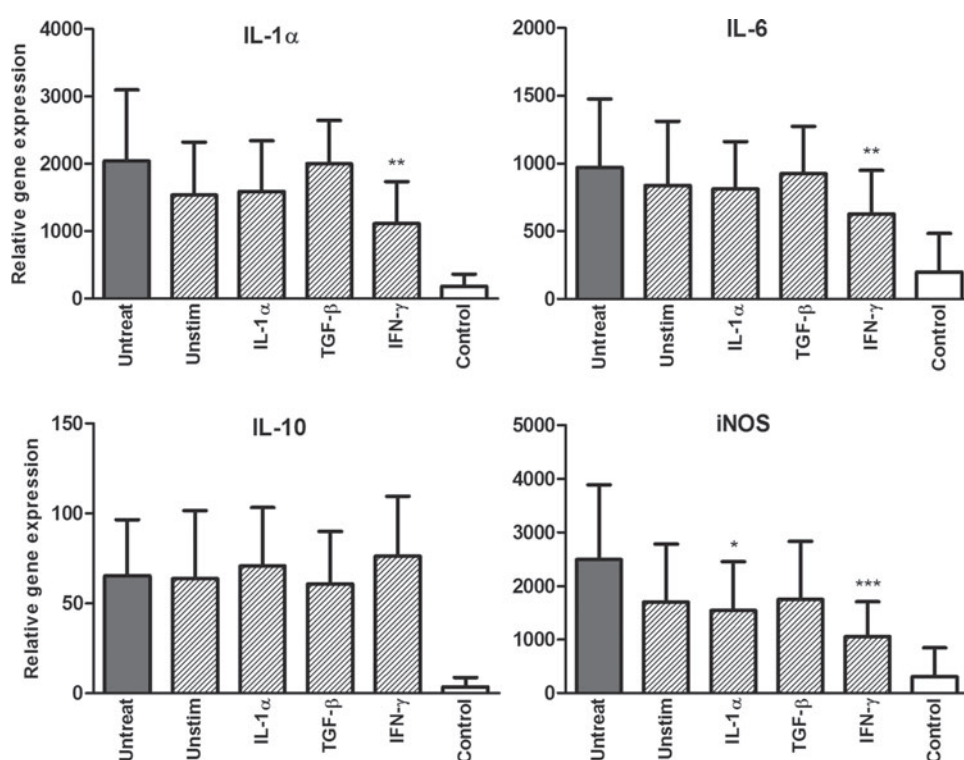


FIG. 7. The effect of MSCs on the expression of genes for cytokines and iNOS. The expression of genes for IL-1 α , IL-6, IL-10, and iNOS in control (white column) and damaged (dashed and gray columns) eyes of untreated mice and mice treated with the systemic administration of unstimulated MSCs or MSCs pretreated with IL-1 α , TGF- β , or IFN- γ (in the graphs labeled as Unstim, IL-1 α , TGF- β , and IFN- γ) was measured by real-time PCR. The expression of the *IL-6* gene was assessed in cells from freshly isolated eyes. The expression of genes for IL-1 α , IL-10, and iNOS was determined in cells from cultures of control and damaged eyes after stimulation with ConA (1.5 μ g/mL) and LPS (1.5 μ g/mL) for 48 h. Values with asterisks are significantly different (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) from the control values (damaged eyes of untreated mice). Each bar represents the mean \pm SD from eight independent experiments.

lymphoid populations, but only MSCs pretreated with IFN- γ decreased the number of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, and CD19⁺CD22⁺ cells significantly. To date, a decreased expression of CD45 has been detected in damaged rat eyes transplanted with MSCs on an amniotic membrane [17], and a reduced infiltration of CD4⁺ cells was observed in injured corneas of mice treated with MSCs [16]. Further, we found that MSCs pretreated with IFN- γ suppressed the infiltration of the damaged eye by CD14⁺, CD80⁺, and CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid populations even more effectively than they inhibited infiltration by lymphoid cells. These results are in agreement with the findings of Yao et al. [18], who showed that the number of CD68⁺ cells infiltrating the site of injury on day 7 was significantly lower in a group treated with MSCs [18]. In addition, the systemic injection of human MSCs significantly reduced the infiltration of neutrophils into the cornea on days 1 and 3 after injury in a rat model of a chemically burned eye [19]. These effects of MSCs on neutrophil infiltration are consistent with our observation that MSCs pretreated with IFN- γ strongly decreased the infiltration of the damaged eye by myeloid cell populations.

We next tested the effects of systemically administered MSCs on the early cytokine environment of the damaged eye. Although we tested a wide range of cytokines, that is, IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, and IFN- γ , only IL-1 α , IL-6, and IL-10 were produced in this phase of inflammation in

significant concentrations. We found that systemically administered MSCs stimulated with IFN- γ significantly decreased the production of IL-6 and IL-1 α with the most profound inhibition of IL-1 α production. This observation is in accordance with the findings of Roddy et al. [19], who showed in a rat model that the production of IL-1 on days 1 and 3 after injury was significantly decreased in corneas treated with human MSCs. On the other hand, Oh et al. [16] observed an increased production of IL-6 in rat corneas 3 weeks after injury and treatment with MSCs. This discrepancy could be explained by the different kinetics of IL-1 and IL-6 production. The peak of IL-1 production occurs at day 3 after injury, while the production of IL-6 culminates later [30].

Further, we detected a highly significant inhibition of iNOS expression and NO production in the damaged eye after treatment with MSCs prestimulated with IFN- γ . Since NO is a toxic and immunomodulatory molecule, its inhibition may represent another mechanism of the therapeutic action of MSCs.

In contrast to Roddy et al. [19], who found a significant increase in IL-10 production 3 weeks after the treatment of injured corneas with MSCs, we detected only a slight enhancement of IL-10 production in the damaged eyes of MSC-treated mice. This discrepancy can be due to the different time points used for IL-10 detection in our and Roddy's studies.

Since MSCs preincubated with various cytokines differ in their immunomodulatory effects, we tested the expression of genes for immunoregulatory molecules in unstimulated MSCs and in MSCs pretreated with IL-1 α , IFN- γ , or TGF- β . Both unstimulated MSCs and cytokine-pretreated MSCs expressed significant levels of genes for TGF- β , HGF, and COX2. It has been already shown that these immunomodulatory molecules are constitutively expressed by MSCs [31]. On the other hand, we did not observe an increase in COX2 expression after stimulation with IFN- γ . English et al. [22] detected an increased expression of COX2 after the stimulation of murine MSCs with IFN- γ , but in their study a 20-times higher concentration of IFN- γ was used. We found that MSCs stimulated with IL-1 α or IFN- γ expressed a significant level of the *iNOS* gene. Accordingly, the treatment of mouse MSCs with IFN- γ and any of three other proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 α , or IL-1 β) induced the expression of several chemokines and *iNOS* [21]. In agreement with other studies [22,31,32], a significant increase in the expression of the *IDO* gene was observed in MSCs pretreated with IFN- γ .

Finally, MSCs stimulated with IFN- γ expressed significant levels of the genes for TGF- β , *IDO*, *iNOS*, HGF, and COX2; there were differences mainly in the expression of *iNOS* and *IDO* in comparison with the other types of MSC stimulation. Although *iNOS* and *IDO* are important immunomodulatory molecules [33–35], other immunoregulatory mechanisms are probably also involved in MSC-mediated immunosuppression. Nevertheless, our results clearly show that systemically administered MSCs rapidly migrate into the site of injury and attenuate the early phase of the inflammatory reaction. Infiltration by both myeloid and lymphoid cells and the local production of proinflammatory cytokines are decreased by MSCs, and MSCs pretreated with IFN- γ are superior in the inhibition of this early inflammatory microenvironment.

Acknowledgments

This work was supported by grants 668012, 889113, and 546613 from the Grant Agency of Charles University; grants P304/11/0653, P301/11/1568, and 14-12580S from the Grant Agency of the Czech Republic; grant NT/14102 from the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic; and the Charles University grant SVV 260083.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- O'Brien TP, Q Li, MF Ashraf, DM Matteson, WJ Stark and CC Chan. (1998). Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol* 116:1470–1474.
- Pellegrini G, CE Traverso, AT Franzi, M Zingirian, R Cancedda and M De Luca. (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349:990–993.
- Du Y, J Chen, JL Funderburgh, X Zhu and L Li. (2003). Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis* 9:635–643.
- Basu S, H Ali and VS Sangwan. (2012). Clinical outcomes of repeat autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns. *Am J Ophthalmol* 153: 643–650.
- Marchini G, E Pedrotti, M Pedrotti, V Barbaro, E Di Iorio, S Ferrari, M Bertolin, B Ferrari, M Passilongo, A Fasolo and D Ponzin. (2012). Long-term effectiveness of autologous cultured limbal stem cell grafts in patients with limbal stem cell deficiency due to chemical burns. *Clin Exp Ophthalmol* 40:255–267.
- Pittenger MF, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, R Douglas, JD Mosca, MA Moorman, DW Simonetti, S Craig and DR Marshak. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
- Gu S, C Xing, J Han, MO Tso and J Hong. (2009). Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis* 15:99–107.
- Păunescu V, E Deak, D Herman, IR Siska, G Tănăsie, C Bunu, S Anghel, CA Tatu, TI Oprea, et al. (2007). In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 11:502–508.
- Nieto-Miguel T, S Galindo, R Reinoso, A Corell, M Martino, JA Pérez-Simón and M Calonge. (2013). In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Curr Eye Res* 38: 933–944.
- Aggarwal S and MF Pittenger. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815–1822.
- Bartholomew A, C Sturgeon, M Siatskas, K Ferrer, K McIntosh, S Patil, W Hardy, S Devine, D Ucker, et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30:42–48.
- Casiraghi F, N Azzollini, P Cassis, B Imberti, M Morigi, D Cugini, RA Cavinato, M Todeschini, S Solini, et al. (2008). Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol* 181:3933–3946.
- Zappia E, S Casazza, E Pedemonte, F Benvenuto, I Bonanni, E Gerdoni, D Giunti, A Ceravolo, F Cazzanti, et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106:1755–1761.
- Le Blanc K, I Rasmusson, B Sundberg, C Götherström, M Hassan, M Uzunel and O Ringdén. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363:1439–1441.
- Jiang TS, L Cai, WY Ji, YN Hui, YS Wang, D Hu and J Zhu. (2010). Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 16:1304–1316.
- Oh JY, MK Kim, MS Shin, HJ Lee, JH Ko, WR Wee and JH Lee. (2008). The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 26:1047–1055.
- Ma Y, Y Xu, Z Xiao, W Yang, C Zhang, E Song, Y Du and L Li. (2006). Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:315–321.

18. Yao L, ZR Li, WR Su, YP Li, ML Lin, WX Zhang, Y Liu, Q Wan and D Liang. (2012). Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 7:e30842.
19. Roddy GW, JY Oh, RH Lee, TJ Bartosh, J Ylostalo, K Coble, RH Rosa Jr. and DJ Prockop. (2011). Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells* 29:1572–1579.
20. Najjar M, G Raicevic, H Fayyad-Kazan, C De Bruyn, D Bron, M Toungouz and L Lagneaux. (2012). Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev* 8:1188–1198.
21. Ren G, L Zhang, X Zhao, G Xu, Y Zhang, AI Roberts, RC Zhao and Y Shi. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2:141–150.
22. English K, FP Barry, CP Field-Corbett and BP Mahon. (2007). IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 110:91–100.
23. Svobodova E, M Krulova, A Zajicova, K Pokorna, J Prochazkova, P Trosan and V Holan. (2012). 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 Dev* 21:901–910.
24. Trosan P, E Svobodova, M Chudickova, M Krulova, A Zajicova and V Holan. (2012). The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process. *Stem Cells Dev* 21:3341–3350.
25. Green LC, DA Wagner, J Glogowski, PL Skipper, JS Wishnok and SR Tannenbaum. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138.
26. Hemeda H, M Jakob, AK Ludwig, B Giebel, S Lang and S Brandau. (2010). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 19:693–706.
27. Duijvestein M, ME Wildenberg, MM Welling, S Hennink, I Molendijk, VL van Zuylen, T Bosse, AC Vos, ES de Jonge-Muller, et al. (2011). Pretreatment with interferon- γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells* 29:1549–1558.
28. Lan Y, S Kodati, HS Lee, M Omoto, Y Jin and SK Chauhan. (2012). Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:3638–3644.
29. Ye J, K Yao and JC Kim. (2006). Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye (Lond)* 20:482–490.
30. Sotozono C, J He, Y Matsumoto, M Kita, J Imanishi and S Kinoshita. (1997). Cytokine expression in the alkali-burned cornea. *Curr Eye Res* 16:670–676.
31. Ryan JM, F Barry, JM Murphy and BP Mahon. (2007). Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149:353–363.
32. Krampera M, L Cosmi, R Angeli, A Pasini, F Liotta, A Andreini, V Santarlasci, B Mazzinghi, G Pizzolo, et al. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:386–398.
33. Holán V, M Krulová, A Zajícová and J Pindjácová. (2002). Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immune system. *Mol Immunol* 38:989–995.
34. Munn DH, MD Sharma, JR Lee, KG Jhaver, TS Johnson, DB Keskin, B Marshall, P Chandler, SJ Antonia, et al. (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297:1867–1870.
35. Meisel R, A Zibert, M Laryea, U Göbel, W Däubener and D Dilloo. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103:4619–4621.

Address correspondence to:

Prof. Vladimír Holan
Institute of Experimental Medicine
Academy of Sciences of the Czech Republic
Videnska 1083
142 20 Prague 4
Czech Republic

E-mail: holan@biomed.cas.cz

Received for publication November 21, 2013

Accepted after revision May 19, 2014

Prepublished on Liebert Instant Online May 21, 2014

6 Diskuze

S využitím *in vivo* modelů, v preklinických i klinických studiích bylo prokázáno, že MSCs by na základě svých imunomodulačních a antiapoptotických schopností mohly představovat výhodný prostředek pro léčbu mnoha onemocnění. Atraktivní vlastností těchto buněk je jejich citlivost k mikroprostředí, ve kterém se nacházejí. Aktuální studie ukazují, že reaktivita a účinky MSCs jsou velmi komplexní a uplatňuje se u nich řada různých mechanismů. V současné době se díky novým znalostem otevírají možnosti, jak terapeutický potenciál MSCs zlepšit a tím zvýšit pravděpodobnost účinné klinické aplikace. V předkládané práci jsme se zaměřili na studium vlivu několika faktorů, které mohou terapeutickou úspěšnost MSCs významně ovlivnit.

Nejprve jsme na modelu alogenní transplantace kůže u myši porovnávali vliv MSCs aplikovaných na nanovláknenných nosičích s inkorporovaným CsA na zánětlivou imunitní odpověď. V předcházející práci bylo prokázáno, že inkorporací CsA do nanovláknenných nosičů se nemění jeho farmakologické účinky, že k jeho uvolňování dochází po dobu několika dnů a že takto upravené nosiče jsou účinné pro potlačení lokální zánětlivé reakce (Holan *et al.*, 2011). Tento způsob lokálního podání se jeví jako výhodný, protože snižuje negativní účinky imunosupresivních látek na organismus, ke kterým dochází po systémovém podání (Dobbels *et al.*, 2008), a zároveň napomáhá cílení, přenosu a úspěšnosti aplikace MSCs (Lee *et al.*, 2016).

Ukázali jsme, že MSCs aplikované pomocí nanovláknenných nosičů migrují do kožního transplantátu a do spádových lymfatických uzlin. U leukocytů izolovaných z lymfatických uzlin (LNCs, lymph node cells) jsme nepozorovali žádné změny v počtu CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ nebo CD11b⁺ buněk v závislosti na terapii, docházelo však ke snížení produkce IFN- γ , a naopak zvýšení IL-10 LNCs z myši léčených pomocí MSCs a MSCs společně s CsA. Podrobná analýza lokální zánětlivé odpovědi ve štěpu odhalila, že až 60 % leukocytů infiltrujících do transplantátu jsou makrofágy. Bylo popsáno, že makrofágy jsou jedny z buněk, které se významnou měrou podílí na rejekci orgánů (Jiang *et al.*, 2014). V naší práci jsme ukázali, že léčba pomocí MSCs a CsA významně snižuje počet infiltrujících makrofágů a rovněž produkci NO a IFN- γ buňkami štěpu. V souladu s naší předchozí studií, kde bylo zjištěno, že nanovláknenné nosiče s inkorporovaným CsA snižují zánětlivou odpověď (Holan *et al.*, 2011), byla nejnižší produkce IFN- γ detekována ve vzorcích z myši, kterým byl podán CsA, nebo MSCs a CsA. K částečnému snížení produkce IFN- γ , počtu infiltrujících makrofágů a s tím spojenou koncentrací NO docházelo

i u myši, kterým byla aplikována samotná nanovlákná. Tento jev může být vysvětlen faktem, že i samotné nanovláknenné nosiče chrání místo poranění, zabraňují přístupu vody a vzduchu a napomáhají regeneraci tkáně (Dubsky *et al.*, 2012).

Snížení exprese IL-1 β , iNOS, IFN- γ a změny v počtu CD45⁺CD11⁺ buněk ve štěpu nás vedly k podrobnější analýze makrofágů infiltrujících do transplantátu. Bylo popsáno, že MSCs mají schopnost potlačovat produkci NO prozánětlivou subpopulací M1 makrofágů a zároveň podporovat vznik a funkce regulačních alternativně aktivovaných M2 makrofágů a tím směřovat imunitní odpověď na protizánětlivou (Kim and Hematti, 2009, Maggini *et al.*, 2010, Cho *et al.*, 2014). Schopnost MSCs indukovat u makrofágů tento regulační fenotyp jsme ověřili nejprve v *in vitro* podmínkách, kdy ko-kultivace MSCs s naivními makrofágy vedla ke zvýšení exprese znaku M2 makrofágů – CD206. Na modelu alogenní transplantace kůže jsme následně pozorovali, že aplikace MSCs společně s CsA vede ke zvýšení exprese CD206 makrofágy ve štěpu, nárůstu počtu F4/80⁺CD206⁺IL10⁺ buněk a s tím související zvýšené produkci IL-10. Podařilo se nám tak prokázat, že aplikace nanovláknenných nosičů s adherovanými MSCs společně s nanovláknem s inkorporovaným CsA potlačují lokální zánětlivou reakci odehrávající se po transplantaci alogenní tkáně. Tato terapeutická strategie podporuje přesmyk klasicky aktivovaných M1 makrofágů na regulační, imunosupresivní fenotyp M2. Naše závěry byly podpořeny i nejnovějšími výzkumy. Aktas *et al.* (2017) analyzovali na svém modelu poranění šlachy u krys léčbu pomocí MSCs preinkubovanými s TNF- α podaných na biodegradovatelných nosičích a pozorovali, že stejně jako u našeho modelu dochází i v tomto případě k polarizaci makrofágů ve směru M2 subpopulace a ke zvýšené produkci IL-10. Navíc také detekovali redukci počtu M1 makrofágů a snížení produkce IL-12 a IL-1 α . V jiné studii bylo prokázáno, že přístup využívající kombinaci nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA v kombinaci s nosiči s adherovanými MSCs může být velice efektivní i pro léčbu závažného poškození rohovky, kde díky němu dochází k potlačení zánětu a snížení neovaskularizace (Cejka *et al.*, 2016a).

Tyto výsledky ukazují, že léčba založená na aplikaci MSCs společně s imunosupresivními látkami se řadí mezi slibné terapeutické strategie. V další části projektu jsme se proto zaměřili na studium působení MSCs společně s imunosupresivními látkami. Ačkoli je známo, že imunosupresivní látky mohou ovlivňovat vlastnosti MSCs (Chen *et al.*, 2008, Ankrum *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2015b) a že při současné aplikaci MSCs a imunosupresiv může docházet k potenciaci imunomodulačních účinků (Hoogduijn *et al.*, 2008, Buron *et al.*, 2009, Eggenhofer *et al.*, 2011), přesné mechanismy tohoto

působení zatím nebyly spolehlivě objasněny. V *in vitro* podmínkách jsme se proto rozhodli otestovat interakci mezi MSCs a terapeutickým efektem pěti imunosupresivních látek (kalcineurinový inhibitor CsA, antimetabolit MMF, inhibitor kinázy mTOR Rapa, a dvě steroidní látky Dex a prednison (Pred)). Ověřili jsme, že žádná z výše zmíněných imunosupresivních látek neovlivňuje expresi povrchových znaků spojených s MSCs (CD11b⁻, CD31⁻, CD45⁻, CD44⁺, CD90.2⁺, CD105⁺). Nejvyšší testované koncentrace MMF a Rapa však významně snižovaly metabolickou aktivitu MSCs. Toto pozorování je v souladu se studií, ve které bylo zjištěno, že vysoké koncentrace Tac, MMF a Rapa snižují přežívání MSC (Hoogduijn *et al.*, 2008).

Bylo popsáno, že MSCs mohou výrazně ovlivňovat diferenciaci T lymfocytů, jejich přežívání i funkce (Svobodova *et al.*, 2012, Mohammadzadeh *et al.*, 2014, Normanton *et al.*, 2014). Různá imunosupresiva pak mohou dále ovlivňovat inhibici proliferace T lymfocytů způsobenou MSCs (Hoogduijn *et al.*, 2008). Velice málo je však známo o vlivu této kombinované terapie na jednotlivé subpopulace T lymfocytů. V této studii jsme se proto zaměřili na objasnění působení MSCs a imunosupresivních léků na apoptózu a aktivaci T lymfocytů a rovnováhu mezi Th1/Th2/Th17/Treg a Tc a ověření produkce cytokinů charakteristických pro tyto lymfocyty. Pro všechny testy byly vybrány klinicky relevantní koncentrace imunosupresiv (Fanigliulo *et al.*, 2015), které neměly vliv na životnost MSCs a významně (ale ne zcela) potlačovaly proliferaci T lymfocytů a jejich produkci cytokinů. Role MSCs v inhibici apoptózy lymfocytů a podpoře jejich přežívání již byla dobře zdokumentována (Xu *et al.*, 2007, Normanton *et al.*, 2014). Naše výsledky potvrzují tato pozorování. Navíc jsme zjistili, že MSCs částečně chrání CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocyty před apoptózou způsobenou vlivem imunosupresivních látek. Zároveň jsme ukázali, že MSCs podporují inhibiční působení imunosupresiv tím, že potlačují expresi aktivačního znaku CD25 u CD8⁺ i CD4⁺ T lymfocytů.

Dále jsme se zaměřili na vliv kombinovaného působení MSCs a imunosupresivních látek na regulaci poměru mezi různými populacemi T lymfocytů, jehož nerovnováha může být příčinou zánětlivých procesů při autoimunitních onemocněních nebo při rejekci transplantátu. Zjistili jsme, že MSCs působí s imunosupresivou synergisticky na snížení zastoupení CD4⁺RORγt⁺ Th17 lymfocytů a současně s tím i procento CD4⁺IL17⁺ buněk v kulturách. Bylo popsáno, že vlivem glukokortikoidů se zvyšuje počet Th17 buněk u pacientů trpících SLE (Prado *et al.*, 2011a). V souladu s tímto zjištěním naše výsledky ukázaly, že přítomnost Pred a Dex v kultuře zvyšuje nejen zastoupení CD4⁺RORγt⁺ ale i CD4⁺IL-17⁺ buněk. Zvýšení počtu Th17 buněk jsme navíc pozorovali i u nižší

koncentrace MMF. Toto pozorování je v rozporu s některými studiemi, které naopak označují MMF za velice účinné imunosupresivum pro potlačení Th17 odpovědi (Abadja *et al.*, 2011, Eggenhofer *et al.*, 2011). Jedním z možných vysvětlení může být rozdílný metabolismus látky v *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Důležitým závěrem naší studie zůstává fakt, že nežádoucí zvýšení prozánětlivé Th17 populace buněk kultivovaných s glukokortikoidy a MMF bylo zcela potlačeno ve skupinách, kde byly přítomny navíc MSCs. Podobný fenomén jsme pak pozorovali u zastoupení $CD4^+T\text{-bet}^+$ Th1 buněk. MSCs efektivně potlačovaly zvýšení počtu Th1 lymfocytů indukované MMF. Významný inhibiční efekt současného podání MSCs a imunosupresiv jsme zaznamenali také při detekci zastoupení $CD4^+IFN\gamma^+$ a $CD8^+IFN\gamma^+$ buněk v jednotlivých kulturách, přičemž k nejsilnějšímu potlačení došlo u skupin ovlivněných CsA a Dex. Zjistili jsme také, že ve všech vzorcích ovlivněných imunosupresivními látkami se vlivem MSCs snižuje exprese GATA-3 a IL-4. Tato schopnost by mohla být výhodná zejména u onemocnění spojených s nadměrnou aktivací Th2 buněk, jako jsou různé alergie nebo SLE. Další důležitou populaci T lymfocytů představují protizánětlivé Treg. Zjistili jsme, že na rozdíl od potlačení zastoupení Th1, Th2, Th17 a Tc buněk dochází při podání MSCs společně s imunosupresivy k navýšení Treg populace. Pozorovali jsme nárůst počtu $CD4^+IL-10^+$ buněk i zvýšení exprese Foxp3, přičemž největší množství $CD4^+Foxp3^+$ lymfocytů jsme detekovali ve skupinách inkubovaných s MSCs spolu s CsA, Rapa a Dex. Tyto změny v produkci cytokinů zcela nekorelují se změnami proporcí jednotlivých subpopulací T lymfocytů. Podobný efekt byl popsán u Treg lymfocytů (Prado *et al.*, 2011b). Navíc bylo také prokázáno, že některá imunosupresiva mohou inhibovat proliferaci T lymfocytů, ale současně neinterferují s jejich funkcí (Miroux *et al.*, 2012). Problematikou společného působení MSCs a imunosupresivních látek se zabývali také Michelo *et al.* (2016), kteří zjistili, že různé kombinace ovlivňují významně také NK buňky, přičemž největší efekt na inhibici aktivace a funkce NK buněk mělo podání MSCs s Dex. To, že podání MSCs společně s léčivými představuje aktuální a atraktivní terapeutickou strategii, dokazují i další studie využívající například chemoterapeutika (Hammam *et al.*, 2016) nebo antibiotika (Sung *et al.*, 2016).

Mezenchymální kmenové buňky jsou velmi citlivé na mikroprostředí, ve kterém se nacházejí a jejich imunomodulační vlastnosti je možné ovlivnit také pomocí cytokinů (Ren *et al.*, 2008; Krampera, 2011). V našem projektu jsme se proto zabývali výzkumem vlivu intravenózně podaných MSCs na akutní fázi zánětu probíhajícího v prvních 72 hodinách po poškození oka. Využívali jsme myší model poškození rohovkového epitelu pomocí

hydroxidu sodného a porovnávali jsme terapeutický vliv MSCs preinkubovaných s IL-1 α , TGF- β a IFN- γ . Poškození rohovky je jednou z nejčastějších příčin ztráty zraku. V současnosti dostupné terapeutické možnosti však čelí mnoha limitacím, jako jsou zejména nebezpečí zjizvení a ztráta transparentnosti, deficitu limbálních kmenových buněk (LSCs, limbal stem cells), nedostatek dárcovských rohovek a poměrně velké riziko imunitní rejekce transplantovaných alogenních LSCs nebo rohovky (Shukla *et al.*, 2016). MSCs by prostřednictvím sekrece TSG-6 (Roddy *et al.*, 2011), schopnosti potlačit oxidativní stres (Cejka *et al.*, 2016b) současně se snížením počtu makrofágů a molekul spojených se zánětem rohovky, jako jsou TNF- α , VEGF nebo CCL-2 (Yao *et al.*, 2012), mohly představovat vhodnou terapeutickou alternativu. Podařilo se nám prokázat, že intravenózně podané MSCs migrují do poškozeného oka a že ke snížení počtu leukocytů v zánětlivé oblasti dochází po aplikaci všech testovaných MSCs (neovlivněné MSCs, MSCs preinkubované s IL-1 α , TGF- β a IFN- γ). Nejvýznamnějších inhibičních změn, především v zastoupení myeloidních buněk, a dále v expresi IL-1 α , IL-6 a NO bylo dosaženo při použití MSCs ovlivněných IFN- γ . V souladu s publikovanými studiemi (Hemeda *et al.*, 2010, Krampera, 2011, Franquesa *et al.*, 2015) jsme prokázali, že preinkubací MSCs s cytokiny dochází ke změně exprese některých imunomodulačních molekul těchto buněk, přičemž největších rozdílů bylo dosaženo preinkubací MSCs s IFN- γ . MSCs ovlivněné tímto cytokinem exprimují vysoké hladiny iNOS a IDO, významně snižují infiltraci leukocytů do poškozeného oka a potlačují tak akutní zánět rohovky. V souladu s naší studií je práce, ve které Torkaman *et al.* (2017) využívali MSCs preinkubované s IFN- γ na myším modelu EAE. Zjistili, že po podání ovlivněných MSCs dochází ke snížení infiltrace leukocytů do zánětlivých oblastí, potlačení produkce prozánětlivých cytokinů a naopak zvýšení zastoupení Treg lymfocytů, což vede k zlepšení symptomů onemocnění.

Zlepšení migrace, viability či imunomodulačních účinků MSCs představuje důležitý předpoklad pro vývoj a úspěšnost buněčné terapie založené na MSCs. V tomto projektu jsme s využitím různých modelů zjistili, že preinkubace MSCs s cytokiny, zejména pak IFN- γ , významně zlepšuje jejich imunomodulační schopnosti a napomáhá potlačit lokální zánětlivou odpověď. Pro zacílení MSCs a usnadnění přenosu je možné využít nanovláknenné nosiče, které navíc mohou do zánětlivého prostředí v místě alogenního transplantátu uvolňovat imunosupresivní látku, jako je například CsA. Tato kombinace pak zajišťuje regulaci lokální imunitní odpovědi a podporuje vznik regulačních M2 makrofágů s regenerativním potenciálem. Zjistili jsme, že kombinace MSCs a různých

imunosupresivních látek s sebou nese obrovský potenciál také pro potlačení imunitní odpovědi spojené s Th1/Th2/Th17 a Tc lymfocyty, a naopak podporuje odpověď založenou na imunosupresivních Treg buňkách a že MSCs mohou potlačovat některé nežádoucí účinky imunosupresiv, jako jsou například apoptóza imunitních buněk nebo nadměrná aktivace Th17 lymfocytů. Na základě našich výsledků lze shrnout, že kombinace MSCs s dalšími přístupy, jako jsou jejich preaktivace, současná imunoprese či využití nanovláknenných nosičů, představuje aktuální a slibnou alternativu ke konvenčně využívaným klinickým protokolům. Je důležité si uvědomit, že interakce mezi MSCs, různými terapiemi a imunitním systémem je velmi komplexní a že pro úspěšnou terapeutickou aplikaci je vždy třeba zvážit konkrétní požadavky kladené na léčbu různých zánětlivých onemocněních i pro transplantační a regenerativní medicínu. Znalost mechanismů, kterými jsou MSCs ovlivňovány a kterými lze jejich schopnosti zlepšit je proto klíčová pro efektivní léčbu a dosažení požadovaných terapeutických cílů.

7 Závěry

Migrační a imunomodulační potenciál MSCs aplikovaných na nanovláčkových nosičích

Lokálně aplikované MSCs migrují z nanovláčkových nosičů do organismu příjemce. Po šesti dnech od aplikace je možné MSCs detekovat v kožním štěpu a ve spádových lymfatických uzlinách. Po podání MSCs společně s CsA dochází k významnému zvýšení sekrece IL-10, a naopak snížení produkce IFN- γ LNCs. Zároveň s tím se snižuje schopnost LNCs stimulovat naivní makrofágy k produkci NO.

Vliv MSCs podaných na nanovláčkových nosičích v kombinaci s CsA na lokální zánětlivou odpověď v kožním alotransplantátu

Až 60 % leukocytů v kožním štěpu tvořily CD11b⁺ buňky. Podrobnou analýzou bylo zjištěno, že po aplikaci MSCs dochází ke snížení sekrece IFN- γ buňkami z kožního štěpu a s tím související produkci NO. Ještě významnější byl tento efekt po aplikaci MSCs společně s CsA. Makrofágy infiltrující štěp v této skupině exprimovaly zvýšené hladiny CD206 a zároveň produkovaly IL-10. V *in vitro* i *in vivo* systému dochází vlivem MSCs k indukci M2 fenotypu makrofágů.

Vliv imunosupresivních látek na fenotyp MSCs

Žádná z testovaných imunosupresivních látek použitých v terapeutických dávkách nemění expresi znaků charakteristických pro MSCs. Nejvyšší koncentrace MMF a Rapa snižují viabilitu MSCs.

Mechanismus, kterým MSCs ovlivňují působení imunosupresivních látek na rovnováhu mezi různými subpopulacemi T lymfocytů

MSCs mají schopnost snižovat apoptózu CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocytů indukované imunosupresivou, zároveň však neinterferují se snížením aktivace způsobené těmito léky. Kombinace MSCs společně s imunosupresivními látkami významně snižuje zastoupení a funkce Th1, Th2, Th17 a Tc lymfocytů, a naopak podporuje protizánětlivou odpověď založenou na Treg buňkách. MSCs mají schopnost potlačit nežádoucí aktivaci Th17 buněk, ke které může docházet vlivem některých imunosupresiv.

Působení systémově podaných MSCs ovlivněných různými cytokiny na akutní fázi zánětu v rohovkovém epitelu

Intravenózně aplikované MSCs specificky migrují do poraněného oka. Nejvýznamnějšího efektu bylo dosaženo při použití MSCs preinkubovaných s IFN- γ , tyto buňky významně potlačují infiltraci leukocyty a snižují produkci IL-1 α , IL-6 a NO v poškozené rohovce

8 Reference

- Abadja, F., Atemkeng, S., Alamartine, E., Berthoux, F. & Mariat, C., 2011. Impact of mycophenolic acid and tacrolimus on Th17-related immune response. *Transplantation*, 92, 396–403.
- Aggarwal, S. & Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105, 1815–1822.
- Aktas, E., Chamberlain, C.S., Saether, E.E., Duenwald-Kuehl, S.E., Kondratko-Mittnacht, J., Stitgen, M., Lee, J.S., Clements, A.E., Murphy, W.L. & Vanderby, R., 2016. Immune modulation with primed mesenchymal stem cells delivered via biodegradable scaffold to repair an Achilles tendon segmental defect. *Journal of Orthopedic Research*, doi 10.1002/jor.23258
- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D.D., Xu, X.T., Qu, C.Y., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W.J., Sun, L.Y. & Shi, S.T., 2012. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, 10, 544–555.
- Alagesan, S. & Griffin, M.D., 2014. Autologous and allogeneic mesenchymal stem cells in organ transplantation: what do we know about their safety and efficacy? *Current Opinion in Organ Transplantation*, 19, 65–72.
- Ankrum, J. & Karp, J.M., 2010. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends in Molecular Medicine*, 16, 203–209.
- Ankrum, J.A., Dastidar, R.G., Ong, J.F., Levy, O. & Karp, J.M., 2014. Performance-enhanced mesenchymal stem cells via intracellular delivery of steroids. *Scientific Reports*, 4. doi: 10.1038/srep04645
- Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C.P., Kuroda, Y., Kandeel, F. & Mullen, Y., 2009. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental Hematology*, 37, 604–615.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R. & Pennesi, G., 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*, 35, 1482–1490.
- Bader, A.M., Klose, K., Bieback, K., Korinth, D., Schneider, M., Seifert, M., Choi, Y.H., Kurtz, A., Falk, V. & Stamm, C., 2015. Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *Plos One*, 10. doi: 10.1371/journal.pone.0138477
- Barminko, J., Kim, J.H., Otsuka, S., Gray, A., Schloss, R., Grumet, M. & Yarmush, M.L., 2011. Encapsulated mesenchymal stromal cells for in vivo transplantation. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 2747–2758.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A. & Hoffman, R., 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30, 42–48.
- Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G. & Uccelli, A., 2007. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 25, 1753–1760.
- Brandau, S., Jakob, M., Bruderek, K., Bootz, F., Giebel, B., Radtke, S., Mauel, K., Jager, M., Flohe, S.B. & Lang, S., 2014. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *Plos One*, 9. Doi: 10.1371/journal.pone.0106903

- Brown, J.M., Nemeth, K., Kushnir-Sukhov, N.M., Metcalfe, D.D. & Mezey, E., 2011. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clinical and Experimental Allergy*, 41, 526–534.
- Buron, F., Perrin, H., Malcus, C., Hequet, O., Thauinat, O., Kholopp-Sarda, M.N., Moulin, F.T. & Morelon, E., 2009. Human mesenchymal stem cells and immunosuppressive drug interactions in allogeneic responses: An in vitro study using human cells. *Transplantation Proceedings*, 41, 3347–3352.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem-cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9, 641–650.
- Carrion, F., Nova, E., Luz, P., Apablaza, F. & Figueroa, F., 2011. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4⁺ T cell activation. *Immunology Letters*, 135, 10–16.
- Cejka, C., Cejkova, J., Trosan, P., Zajicova, A., Sykova, E. & Holan, V., 2016a. Transfer of mesenchymal stem cells and cyclosporine A on alkali-injured rabbit cornea using nanofiber scaffolds strongly reduces corneal neovascularization and scar formation. *Histology and Histopathology*, 31, 969–980.
- Cejka, C., Holan, V., Trosan, P., Zajicova, A., Javorkova, E. & Cejkova, J., 2016b. The favorable effect of mesenchymal stem cell treatment on the antioxidant protective mechanism in the corneal epithelium and renewal of corneal optical properties changed after alkali burns. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2016/5843809
- Chamberlain, G., Wright, K., Rot, A., Ashton, B. & Middleton, J., 2008. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *Plos One*, 3. doi: 10.1371/journal.pone.0002934
- Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., Ponzio, N.M. & Rameshwar, P., 2006. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, 107, 4817–4824.
- Chang, J.W., Hung, S.P., Wu, H.H., Wu, W.M., Yang, A.H., Tsai, H.L., Yang, L.Y. & Lee, O.K., 2011. Therapeutic effects of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental lupus nephritis. *Cell Transplantation*, 20, 245–257.
- Chao, K., Zhang, S.H., Qiu, Y., Chen, X.Y., Zhang, X.R., Cai, C., Peng, Y.W., Mao, R., Pevsner-Fischer, M., Ben-Horin, S., Elinav, E., Zeng, Z.R., Chen, B.L., He, Y., Xiang, A.P. & Chen, M.H., 2016. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via CD5⁺ B regulatory cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7. doi: 10.1186/s13287-016-0376-2
- Chen, T.L., Wang, J.A., Shi, H., Gui, C., Luo, R.H., Xie, X.J., Xiang, M.X., Zhang, X. & Cao, J., 2008. Cyclosporin A pre-incubation attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 68, 585–593.
- Chew, S.Y., Wen, Y., Dzenis, Y. & Leong, K.W., 2006. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 4751–4770.
- Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A., Frassoni, F., Bartolome, S.T., Sambuceti, G., Traggiai, E. & Uccelli, A., 2011. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 17384–17389.
- Cho, D.I., Kim, M.R., Jeong, H.Y., Jeong, H.C., Jeong, M.H., Yoon, S.H., Kim, Y.S. & Ahn, Y., 2014. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance

- in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental and Molecular Medicine*, 46. doi: 10.1038/emm.2013.135.
- Choi, H., Lee, R.H., Bazhanov, N., Oh, J.Y. & Prockop, D.J., 2011. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood*, 118, 330–338.
- Collins, E.L., Qi, M. & Gilkeson, G., 2015. Effect on B cell function by mesenchymal stem cells of different derivation. *Stem Cell Research & Therapy*, 5, doi: 10.4172/2157-7633.1000294
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V. & Uccelli, A., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107, 367–372.
- Cui, R.T., Rekasi, H., Hepner-Schefczyk, M., Fessmann, K., Petri, R.M., Bruderek, K., Brandau, S., Jager, M. & Flohe, S.B., 2016. Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. *Stem Cell Research & Therapy*, 7. doi: 10.1186/s13287-016-0353-9
- De Becker, A. & Riet, I. V., 2016. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Journal of Stem Cells*, 8, 73–87
- De La Garza-Rodea, A.S., Verweij, M.C., Boersma, H., Van Der Velde-Van Dijke, I., De Vries, A.A.F., Hoeben, R.C., Van Bekkum, D.W., Wiertz, E. & Knaan-Shanzer, S., 2011. Exploitation of herpesvirus immune evasion strategies to modify the immunogenicity of human mesenchymal stem cell transplants. *Plos One*, 6. doi: 10.1371/journal.pone.0014493
- Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A. & Hoffman, R., 2003. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101, 2999–3001.
- Dhingra, S., Li, P., Huang, X.P., Guo, J., Wu, J., Mihic, A., Li, S.H., Zang, W.F., Shen, D., Weisel, R.D., Singal, P.K. & Li, R.K., 2013. Preserving prostaglandin E2 level prevents rejection of implanted allogeneic mesenchymal stem cells and restores postinfarction ventricular function. *Circulation*, 128, 69–78.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S. & Gianni, A.M., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99, 3838–3843.
- Di Trapani, M., Bassi, G., Midolo, M., Gatti, A., Kamga, P.T., Cassaro, A., Carusone, R., Adamo, A. & Krampera, M., 2016. Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep24120.
- Dobbels, F., Moons, P., Abraham, I., Larsen, C.P., Dupont, L. & De Geest, S., 2008. Measuring symptom experience of side-effects of immunosuppressive drugs: The modified transplant symptom occurrence and distress scale. *Transplant International*, 21, 764–773.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J. & Horwitz, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315–317.
- Dominici, M., Paolucci, P., Conte, P. & Horwitz, E.M., 2009. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. *Transplantation*, 87, 36–42.

- Doorn, J., Moll, G., Le Blanc, K., Van Blitterswijk, C. & De Boer, J., 2012. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 18, 101–115.
- Dubsky, M., Kubinova, S., Sirc, J., Voska, L., Zajicek, R., Zajicova, A., Lesny, P., Jirkovska, A., Michalek, J., Munzarova, M., Holan, V. & Sykova, E., 2012. Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 23, 931–941.
- Duijvestein, M., Wildenberg, M.E., Welling, M.M., Hennink, S., Molendijk, I., Van Zuylen, V.L., Bosse, T., Vos, A.C.W., De Jonge-Muller, E.S.M., Roelofs, H., Van Der Weerd, L., Verspaget, H.W., Fibbe, W.E., Velde, A.A.T., Van Den Brink, G.R. & Hommes, D.W., 2011. Pretreatment with interferon- γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*, 29, 1549–1558.
- Eggenhofer, E., Renner, P., Soeder, Y., Popp, F.C., Hoogduijn, M.J., Geissler, E.K., Schlitt, H.J. & 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-Corbette, C.P. & Mahon, B.P., 2007. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters*, 110, 91–100.
- English, K., Ryan, J.M., Tobin, L., Murphy, M.J., Barry, F.P. & 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.
- Fanigliulo, D., Lazzerini, P.E., Capecci, P.L., Ulivieri, C., Baldari, C.T. & Laghi-Pasini, F., 2015. Clinically-relevant cyclosporin and rapamycin concentrations enhance regulatory T cell function to a similar extent but with different mechanisms: An in-vitro study in healthy humans. *International Immunopharmacology*, 24, 276–284.
- Favaro, E., Carpanetto, A., Caorsi, C., Giovarelli, M., Angelini, C., Cavallo-Perin, P., Tetta, C., Camussi, G. & Zanone, M.M., 2016. Human mesenchymal stem cells and derived extracellular vesicles induce regulatory dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*, 59, 325–333.
- Franquesa, M., Mensah, F.K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., Delarosa, O., Laman, J.D., Grinyo, J.M., Weimar, W., Betjes, M.G.H., Baan, C.C. & Hoogduijn, M.J., 2015. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells*, 33, 880–891.
- Furlani, D., Ugurlucan, M., Ong, L., Bieback, K., Pittermann, E., Westien, I., Wang, W.W., Yerebakan, C., Li, W.Z., Gaebel, R., Li, R.K., Vollmar, B., Steinhoff, G. & Ma, N., 2009. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvascular Research*, 77, 370–376.
- Ghannam, S., Pene, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C. & Yssel, H., 2010. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *Journal of Immunology*, 185, 302–312.
- Gholamrezanezhad, A., Mirpour, S., Bagheri, M., Mohamadnejad, M., Alimoghaddam, K., Abdolazadeh, L., Saghari, M. & Malekzadeh, R., 2011. In vivo tracking of In-111-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nuclear Medicine and Biology*, 38, 961–967.

- Girdlestone, J., 2016. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy*, 8, 1405–1416.
- Girdlestone, J., Pido-Lopez, J., Srivastava, S., Chai, J.G., Leaver, N., Galleu, A., Lombardi, G. & Navarrete, C.V., 2015. Enhancement of the immunoregulatory potency of mesenchymal stromal cells by treatment with immunosuppressive drugs. *Cytotherapy*, 17, 1188–1199.
- Glenn, J.D. & Whartenby, K. A., 2014. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6, 526–539
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W.F. & Dazzi, F., 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105, 2821–2827.
- Goodwin, M., Sueblinvong, V., Eisenhauer, P., Ziats, N.P., Leclair, L., Poynter, M.E., Steele, C., Rincon, M. & Weiss, D.J., 2011. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem Cells*, 29, 1137–1148.
- Gu, Y.-Z., Xue, Q., Chen, Y.-J., Yu, G.-H., Qing, M.-D., Shen, Y., Wang, M.-Y., Shi, Q. & Zhang, X.-G., 2013. Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. *Human Immunology*, 74, 267–276.
- Gu, Y.J., Li, T., Ding, Y.L., Sun, L.X., Tu, T., Zhu, W., Hu, J.B. & Sun, X.C., 2016. Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 13, 5207–5215.
- Guo, Y.W., Chan, K.H., Lai, W.H., Siu, C.W., Kwan, S.C., Tse, H.F., Ho, P.W.L. & Ho, J.W.M., 2013a. Human mesenchymal stem cells upregulate CD1d^{high}CD5⁺ regulatory B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimmunomodulation*, 20, 294–303.
- Guo, Z.X., Zhou, X.H., Li, J., Meng, Q.S., Cao, H., Kang, L., Ni, Y.K., Fan, H.M. & Liu, Z.M., 2013b. Mesenchymal stem cells reprogram host macrophages to attenuate obliterative bronchiolitis in murine orthotopic tracheal transplantation. *International Immunopharmacology*, 15, 726–734.
- Hammam, O.A., Elkhafif, N., Attia, Y.M., Mansour, M.T., Elmazar, M.M., Abdelsalam, R.M., Kenawy, S.A. & El-Khatib, A.S., 2016. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells combined with praziquantel as a potential therapy for *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis. *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep21005
- Hare, J.M., Fishman, J.E., Gerstenblith, G., Velazquez, D.L.D., Zambrano, J.P., Suncion, V.Y., Tracy, M., Gherlin, E., Johnston, P.V., Brinker, J.A., Breton, E., Davis-Sproul, J., Schulman, I.H., Byrnes, J., Mendizabal, A.M., Lowery, M.H., Rouy, D., Altman, P., Foo, C.W.P., Ruiz, P., Amador, A., Da Silva, J., Mcniece, I.K. & Heldman, A.W., 2012. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy The POSEIDON randomized trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 308, 2369–2379.
- Hemeda, H., Jakob, M., Ludwig, A.K., Giebel, B., Lang, S. & Brandau, S., 2010. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 19, 693–706.
- Hermankova, B., Zajicova, A., Javorkova, E., Chudickova, M., Trosan, P., Hajkova, M., Krulova, M. & Holan, V., 2016. Suppression of IL-10 production by activated B

- cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- γ -treated mesenchymal stem cells. *Immunobiology*, 221, 129–136.
- Hof-Nahor, I., Leshansky, L., Shivtiel, S., Eldor, L., Aberdam, D., Itskovitz-Eldor, J. & Berrih-Aknin, S., 2012. Human mesenchymal stem cells shift CD8⁺T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes. *Journal of Cell Science*, 125, 4640–4650.
- Hofer, H.R. & Tuan, R.S., 2016. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Research & Therapy*, 7. doi: 10.1186/s13287-016-0394-0.
- Holan, V., Chudickova, M., Trosan, P., Svobodova, E., Krulova, M., Kubinova, S., Sykova, E., Sirc, J., Michalek, J., Juklickova, M., Munzarova, M. & Zajicova, A., 2011. Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *Journal of Controlled Release*, 156, 406–412.
- Holan, V., Hermankova, B., Bohacova, P., Kossel, J., Chudickova, M., Hajkova, M., Krulova, M., Zajicova, A. & Javorkova, E., 2016. Distinct immunoregulatory mechanisms in mesenchymal stem cells: role of the cytokine environment. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12, 654–663.
- Hoogduijn, M.J., Crop, M.J., Korevaar, S.S., Peeters, A.M.A., Eijken, M., Maat, L.P.W.M., Balk, A.H.M.M., Weimar, W. & Baan, C.C., 2008. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation*, 86, 1283–1291.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., Mcnall, R.Y., Muul, L. & Hofmann, T., 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8932–8937.
- Isakova, I.A., Lanclos, C., Bruhn, J., Kuroda, M.J., Baker, K.C., Krishnappa, V. & Phinney, D.G., 2014. Allo-reactivity of mesenchymal stem cells in rhesus macaques is dose and haplotype dependent and limits durable cell engraftment in vivo. *Plos One*, 9. doi: 10.1371/journal.pone.0087238.
- Jiang, D.S., Muschhammer, J., Qi, Y., Kugler, A., De Vries, J.C., Saffarzadeh, M., Sindrilaru, A., Beken, S.V., Wlaschek, M., Kluth, M.A., Ganss, C., Frank, N.Y., Frank, M.H., Preissner, K.T. & Scharffetter-Kochanek, K., 2016. Suppression of neutrophil-mediated tissue damage-A novel skill of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 34, 2393–2406.
- Jiang, T.S., Cai, L., Ji, W.Y., Hui, Y.N., Wang, Y.S., Hu, D. & Zhu, J., 2010. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Molecular Vision*, 16, 1304–1316.
- Jiang, X., Tian, W., Sung, Y.K., Qian, J. & Nicolls, M.R., 2014. Macrophages in solid organ transplantation. *Vascular Cell*, 6: 5. doi: 10.1186/2045-824X-6-5.
- Jiang, X.X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.X., Wu, Y., Yu, X.D. & Mao, N., 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105, 4120–4126.
- Jin, G.R., Prabhakaran, M.P. & Ramakrishna, S., 2011. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7, 3113–3122.
- Jun, E.K., Zhang, Q., Yoon, B.S., Moon, J.H., Lee, G., Park, G., Kang, P.J., Lee, J.H., Kim, A. & You, S., 2014. Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through

- TGF- β /SMAD2 and PI3K/Akt pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 605–628.
- Ka-Fai Ma, O. & Chan, K. H., 2016. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World Journal of Stem Cells*, 8, 268–278.
- Kavanagh, H. & Mahon, B.P., 2011. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy*, 66, 523–531.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klueter, H. & Bieback, K., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 1294–1301.
- Kim, H.S., Yun, J.W., Shin, T.H., Lee, S.H., Lee, B.C., Yu, K.R., Seo, Y., Lee, S., Kang, T.W., Choi, S.W., Seo, K.W. & Kang, K.S., 2015a. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE(2) and TGF- β 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation. *Stem Cells*, 33, 1254–1266.
- Kim, J. & Hematti, P., 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*, 37, 1445–1453.
- 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. & 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. doi: 10.1186/s13287-015-0197-8.
- Kim, S.S., Song, C.K., Shon, S.K., Lee, K.Y., Kim, C.H., Lee, M.J. & Wang, L., 2009. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell and Tissue Research*, 336, 59–66.
- Koc, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W., Dyhouse, S.M., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I. & Lazarus, H.M., 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 18, 307–316.
- Krampera, M., 2011. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia*, 25, 1408–1414.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S. & Annunziato, F., 2006. Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 386–398.
- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E. & 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., Rasmusson, I., Gotherstrom, C., Seidel, C., Sundberg, B., Sundin, M., Rosendahl, K., Tammik, C. & Ringden, O., 2004a. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60, 307–315.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M. & Ringden, O., 2004b. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363, 1439–1441.
- Lee, D.E., Ayoub, N. & Agrawal, D.K., 2016. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Research & Therapy*, 7. doi: 10.1186/s13287-016-0303-6.

- Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., Kota, D.J., Ylostalo, J., Larson, B.L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P. & Prockop, D.J., 2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, 5, 54–63.
- Leibacher, J. & Henschler, R., 2016. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7. doi: 10.1186/s13287-015-0271-2.
- Li, J.-F., Zhang, D.-J., Geng, T., Chen, L., Huang, H., Yin, H.-L., Zhang, Y.-Z., Lou, J.-Y., Cao, B. & Wang, Y.-L., 2014a. The potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Cell Transplantation*, 23, S113–S122.
- Li, M.F., Sun, X.Y., Kuang, X.C., Liao, Y., Li, H.B. & Luo, D.Z., 2014b. Mesenchymal stem cells suppress CD8⁺ T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E-2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor-beta. *Clinical and Experimental Immunology*, 178, 516–524.
- Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Wang, J., Han, Z. & Sun, L., 2009. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 15, 644–646.
- Liu, H., Lu, K., Macary, P.A., Wong, K.L., Heng, A., Cao, T. & Kemeny, D.M., 2012. Soluble molecules are key in maintaining the immunomodulatory activity of murine mesenchymal stromal cells. *Journal of Cell Science*, 125, 200–208.
- Liu, K.M., Ji, K.Q., Guo, L., Wu, W., Lu, H.X., Shan, P.Y. & Yan, C.Z., 2014. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular Research*, 92, 10–18.
- Liu, W.H., Liu, J.J., Wu, J., Zhang, L.L., Liu, F., Yin, L., Zhang, M.M. & 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. doi: 10.1371/journal.pone.0055487
- Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegria, J., Contreras, R., Nova-Lamperti, E., Tejedor, G., Noel, D., Jorgensen, C., Figueroa, F., Djouad, F. & Carrion, F., 2013. Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4. doi: 10.1186/s13287-013-0216-2
- Maccario, R., Podesta, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., Daudt, L., Ibatci, A., Piaggio, G., Pozzi, S., Frassoni, F. & Locatelli, F., 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica-the Hematology Journal*, 90, 516–525.
- Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzon, I.M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Canones, C., Raiden, S., Vermeulen, M. & Geffner, J.R., 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *Plos One*, 5. doi: 10.1371/journal.pone.0009252.
- Makela, T., Takalo, R., Arvola, O., Haapanen, H., Yannopoulos, F., Blanco, R., Ahvenjarvi, L., Kiviluoma, K., Kerkela, E., Nystedt, J., Juvonen, T. & Lehenkari, P., 2015. Safety and biodistribution study of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model. *Cytotherapy*, 17, 392–402.

- Merino-Gonzalez, C., Zuniga, F.A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., Salomon, C. & Aguayo, C., 2016. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potencial clinical application. *Frontiers in Physiology*, 7. doi: 10.3389/fphys.2016.00024
- Michelo, C.M., Fasse, E., Van Cranenbroek, B., Linda, K., Van Der Meer, A., Abdelrazik, H. & Joosten, I., 2016. Added effects of dexamethasone and mesenchymal stem cells on early natural killer cell activation. *Transplant Immunology*, 37, 1–9.
- Miroux, C., Morales, O., Ouaguia, L., Aoudjehane, L., Boleslawski, E., Pancre, V., De Launoit, Y., Calmus, Y., Conti, F. & Delhem, N., 2012. Corticosteroids do not reverse the inhibitory effect of cyclosporine on regulatory T-cell activity in contrast to mycophenolate mofetil. *Transplantation Proceedings*, 44, 2834–2839.
- Mohammadzadeh, A., Pourfathollah, A.A., Shahrokhi, S., Hashemi, S.M., Moradi, S.L.A. & Soleimani, M., 2014. Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets. *International Immunopharmacology*, 20, 316–321.
- Mudrabettu, C., Kumar, V., Rakha, A., Yadav, A.K., Ramachandran, R., Kanwar, D.B., Nada, R., Minz, M., Sakhuja, V., Marwaha, N. & Jha, V., 2015. Safety and efficacy of autologous mesenchymal stromal cells transplantation in patients undergoing living donor kidney transplantation: A pilot study. *Nephrology*, 20, 25–33.
- Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sato, T., Uno, T., Itoh, J., Kato, S., Ito, M., Hotta, T. & Ando, K., 2006. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107, 1878–1887.
- Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R., 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113, 1161–1166.
- Nie, Y., Lau, C.S., Lie, A.K.W., Chan, G.C.F. & Mok, M.Y., 2010. Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19, 850–859.
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0106673.
- Nowakowski, A., Drela, K., Rozycka, J., Janowski, M. & Lukomska, B., 2016. Engineered mesenchymal stem cells as an anti-cancer trojan horse. *Stem Cells and Development*, 25, 1513–1531.
- Nowakowski, A., Walczak, P., Janowski, M. & Lukomska, B., 2015. Genetic engineering of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells and Development*, 24, 2219–2242.
- Park, M., Kim, Y.H., Ryu, J.H., Woo, S.Y. & Ryu, K.H., 2015. Immune suppressive effects of tonsil-derived mesenchymal stem cells on mouse bone-marrow-derived dendritic cells. *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2015/106540.
- Payne, N.L., Sun, G.Z., McDonald, C., Moussa, L., Emerson-Webber, A., Loisel-Meyer, S., Medin, J.A., Siatskas, C. & Bernard, C.C.A., 2013. Human adipose-derived mesenchymal stem cells engineered to secrete IL-10 inhibit APC function and limit CNS autoimmunity. *Brain Behavior and Immunity*, 30, 103–114.
- Peng, Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Huang, K., Liu, L., Li, H., Zhou, M., Huang, F., Fan, Z., Sun, J., Ke, M., Li, X., Zhang, Q. & Xiang, A.P., 2015. Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through

- an increase of CD5⁺regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia*, 29, 636–646.
- Peng, Y., Ke, M., Xu, L., Liu, L., Chen, X., Xia, W., Li, X., Chen, Z., Ma, J., Liao, D., Li, G., Fang, J., Pan, G. & Xiang, A.P., 2013. Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation*, 95, 161–168.
- Perico, N., Casiraghi, F., Inrona, M., Gotti, E., Todeschini, M., Cavinato, R.A., Capelli, C., Rambaldi, A., Cassis, P., Rizzo, P., Cortinovia, M., Marasa, M., Golay, J., Noris, M. & Remuzzi, G., 2011. Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 412–422.
- Pessina, A., Leonetti, C., Artuso, S., Benetti, A., Dessy, E., Pascucci, L., Passeri, D., Orlandi, A., Berenzi, A., Bonomi, A., Cocce, V., Ceserani, V., Ferri, A., Dossena, M., Mazzuca, P., Ciusani, E., Ceccarelli, P., Caruso, A., Portolani, N., Sisto, F., Parati, E. & Alessandri, G., 2015. Drug-releasing mesenchymal cells strongly suppress B16 lung metastasis in a syngeneic murine model. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 34. doi: 10.1186/s13046-015-0200-3.
- Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I.R. & Zipori, D., 2007. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109, 1422–1432.
- Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G.W., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B. & Bartholomew, A., 2008. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European Journal of Immunology*, 38, 1745–1755.
- Popp, F.C., Eggenhofer, E., Renner, P., Slowik, P., Lang, S.A., Kaspar, H., Geissler, E.K., Piso, P., Schlitt, H.J. & Dahlke, M.H., 2008. Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transplant Immunology*, 20, 55–60.
- Prado, C., De Paz, B., Gomez, J., Lopez, P., Rodriguez-Carrio, J. & Suarez, A., 2011a. Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology*, 50, 1794–1801.
- Prado, C., Gomez, J., Lopez, P., De Paz, B., Gutierrez, C. & Suarez, A., 2011b. Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology*, 216, 386–392.
- Rafei, M., Campeau, P.A., Aguilar-Mahecha, A., Buchanan, M., Williams, P., Birman, E., Yuan, S., Young, Y.K., Boivin, M.N., Forner, K., Basik, M. & Galipeau, J., 2009. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *Journal of Immunology*, 182, 5994–6002.
- Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L. & 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.
- Raicevic, G., Rouas, R., Najjar, M., Stordeur, P., Boufker, H.I., Bron, D., Martiat, P., Goldman, M., Nevejsignsky, M.T. & Lagneaux, L., 2010. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Human Immunology*, 71, 235–244.

- Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B. & Ringden, O., 2007. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 65, 336–343.
- Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B. & Le Blanc, K., 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 76, 1208–1213.
- Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B. & Le Blanc, K., 2005. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Experimental Cell Research*, 305, 33–41.
- Ren, G.W., Zhang, L.Y., Zhao, X., Xu, G.W., Zhang, Y.Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C. & Shi, Y.F., 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2, 141–150.
- Ren, G.W., Zhao, X., Zhang, L.Y., Zhang, J.M., L'huillier, A., Ling, W.F., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S.T., Shao, C.S. & Shi, Y.F., 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.
- Ribeiro, A., Laranjeira, P., Mendes, S., Velada, I., Leite, C., Andrade, P., Santos, F., Henriques, A., Graos, M., Cardoso, C.M.P., Martinho, A., Pais, M., Da Silva, C.L., Cabral, J., Trindade, H. & Paiva, A., 2013. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4. doi: 10.1186/scrt336.
- Roddy, G.W., Oh, J.Y., Lee, R.H., Bartosh, T.J., Ylostalo, J., Coble, K., Rosa, R.H. & Prockop, D.J., 2011. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells*, 29, 1572–1579.
- Roemeling-Van Rhijn, M., Mensah, F.K.F., Korevaar, S.S., Leijds, M.J., Van Osch, G., Ijzermans, J.N.M., Betjes, M.G.H., Baan, C.C., Weimar, W. & Hoogduijn, M.J., 2013. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*, 4. doi: 10.3389/fimmu.2013.00203.
- Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M.N., Bouchentouf, M., Spaner, D.E. & Galipeau, J., 2009. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *Journal of Immunology*, 182, 7963–7973.
- Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M.N., Stagg, J. & Galipeau, J., 2007. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN- γ , TGF- β , and cell density. *Journal of Immunology*, 179, 1549–1558.
- Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R.J., Bistrrian, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J. & Henschler, R., 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108, 3938–3944.
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M. & Mahon, B.P., 2007. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 149, 353–363.
- Saparov, A., Ogay, V., Nurgozhin, T., Jumabay, M. & Chen, W.C.W., 2016. Preconditioning of human mesenchymal stem cells to enhance their regulation of the immune response. *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2016/3924858

- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D. & Shimizu, H., 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology*, 180, 2581–2587.
- Sbano, P., Cuccia, A., Mazzanti, B., Urbani, S., Giusti, B., Lapini, I., Rossi, L., Abbate, R., Marseglia, G., Nannetti, G., Torricelli, F., Miracco, C., Bosi, A., Fimiani, M. & Saccardi, R., 2008. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. *Archives of Dermatological Research*, 300, 115–124.
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D. & Deschaseaux, F., 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⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*, 26, 212–222.
- Shukla, S., Tavakkoli, F., Singh, V. & Sangwan, V.S., 2016. Mesenchymal stem cell therapy for corneal diseases. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 4, 917–926.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C. & 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.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C. & Moretta, L., 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107, 1484–1490.
- Spees, J.L., Lee, R.H. & Gregory, C.A., 2016. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*, 7. doi: 10.1186/s13287-016-0363-7.
- Stagg, J., Pommey, S., Eliopoulos, N. & Galipeau, J., 2006. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*, 107, 2570–2577.
- Sullivan, C., Barry, F., Ritter, T., O'flatharta, C., Howard, L., Shaw, G., Anegon, I. & Murphy, M., 2013. Allogeneic murine mesenchymal stem cells: migration to inflamed joints in vivo and amelioration of collagen induced arthritis when transduced to express CTLA4Ig. *Stem Cells and Development*, 22, 3203–3213.
- Sung, P.H., Chiang, H.J., Chen, C.H., Chen, Y.L., Huang, T.H., Zhen, Y.Y., Chang, M.W., Liu, C.F., Chung, S.Y., Chai, H.T., Sun, C.K. & Yip, H.K., 2016. Combined therapy with adipose-derived mesenchymal stem cells and ciprofloxacin against acute urogenital organ damage in rat sepsis syndrome induced by intrapelvic injection of cecal bacteria. *Stem Cells Translational Medicine*, 5, 782–792.
- Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P. & Holan, V., 2012. 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.
- Torkaman, M., Ghollasi, M., Mohammadnia-Afrouzi, M., Salimi, A. & Amari, A., 2017. The effect of transplanted human Wharton's jelly mesenchymal stem cells treated with IFN- γ on experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Cellular Immunology*, 311, 1–12.
- Toupet, K., Maumus, M., Peyrafitte, J.A., Bourin, P., Van Lent, P., Ferreira, R., Orsetti, B., Pirot, N., Casteilla, L., Jorgensen, C. & Noel, D., 2013. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis and Rheumatism*, 65, 1786–1794.

- Trosan, P., Javorkova, E., Zajicova, A., Hajkova, M., Hermankova, B., Kossl, J., Krulova, M. & Holan, V., 2016. The supportive role of insulin-like growth factor-I in the differentiation of murine mesenchymal stem cells into corneal-like cells. *Stem Cells and Development*, 25, 874–881.
- Tu, Z.D., Li, Q., Bu, H. & Lin, F., 2010. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells and Development*, 19, 1803–1809.
- Vasandan, A.B., Jahnvi, S., Shashank, C., Prasad, P., Kumar, A. & Prasanna, J., 2016. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE(2)-dependent mechanism. *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep38308.
- Wang, H., Qi, F., Dai, X., Tian, W., Liu, T., Han, H., Zhang, B., Li, H., Zhang, Z. & Du, C., 2014. Requirement of B7-H1 in mesenchymal stem cells for immune tolerance to cardiac allografts in combination therapy with rapamycin. *Transplant Immunology*, 31, 65–74.
- Wang, L.T., Ting, C.H., Yen, M.L., Liu, K.J., Sytwu, H.K., Wu, K.K. & Yen, B.L., 2016. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *Journal of Biomedical Science*, 23. doi: 10.1186/s12929-016-0289-5.
- Wang, Y., Zhang, Z., Chi, Y., Zhang, Q., Xu, F., Yang, Z., Meng, L., Yang, S., Yan, S., Mao, A., Zhang, J., Yang, Y., Wang, S., Cui, J., Liang, L., Ji, Y., Han, Z.B., Fang, X. & Han, Z.C., 2013. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation. *Cell Death & Disease*, 4. doi: 10.1038/cddis.2013.480
- Waterman, R.S., Henkle, S.L. & Betancourt, A.M., 2012. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *Plos One*, 7. doi:10.1371/journal.pone.0045590.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L. & 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. doi:10.1371/journal.pone.0010088.
- Wu, Y.J., Chen, L., Scott, P.G. & Tredget, E.E., 2007. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, 25, 2648–2659.
- Xu, G., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, G. & Shi, Y., 2007. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, 745–750.
- Yan, Z.D., Zhuansun, Y.X., Liu, G.R., Chen, R., Li, J.G. & Ran, P.X., 2014. Mesenchymal stem cells suppress T cells by inducing apoptosis and through PD-1/B7-H1 interactions. *Immunology Letters*, 162, 248–255.
- Yang, J., Liu, X.X., Fan, H., Tang, Q., Shou, Z.X., Zuo, D.M., Zou, Z., Xu, M., Chen, Q.Y., Peng, Y., Deng, S.J. & Liu, Y.J., 2015. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via attenuating colon inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Plos One*, 10. doi: 10.1371/journal.pone.0140551.
- Yao, L., Li, Z.R., Su, W.R., Li, Y.P., Lin, M.L., Zhang, W.X., Liu, Y., Wan, Q. & Liang, D., 2012. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *Plos One*, 7. doi: 10.1371/journal.pone.0030842
- Yuan, T., Li, K.F., Guo, L.K., Fan, H.S. & Zhang, X.D., 2011. Modulation of immunological properties of allogeneic mesenchymal stem cells by collagen

- scaffolds in cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 98A, 332–341.
- Zajicova, A., Pokorna, K., Lencova, A., Krulova, M., Svobodova, E., Kubinova, S., Sykova, E., Pradny, M., Michalek, J., Svobodova, J., Munzarova, M. & Holan, V., 2010. Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds. *Cell Transplantation*, 19, 1281–1290.
- Zangi, L., Margalit, R., Reich-Zeliger, S., Bachar-Lustig, E., Beilhack, A., Negrin, R. & Reisner, Y., 2009. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, 27, 2865–2874.
- Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G. & Uccelli, A., 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106, 1755–1761.
- Zhang, B., Liu, R., Shi, D., Liu, X., Chen, Y., Diu, X., Zhu, X., Lu, Ch., Liang, W., Liao, L., Zenke, M. & Chao, R.C.H., 2009. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2 dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*, 113, 46–57
- Zhang, J., Huang, X.W., Wang, H.J., Liu, X.Y., Zhang, T., Wang, Y.C. & Hu, D.H., 2015. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 6. doi: 10.1186/s13287-015-0240-9.
- Zhang, B., Liu, R., Shi, D., Liu, X., Chen, Y., Diu, X., Zhu, X., Lu, Ch., Liang, W., Liao, L., Zenke, M. & Chao, R.C.H., 2009. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2 dependent regulatory dendritic cell population. *Blood*, 113, 46–57
- Zhao, Q., Ren, H & Han, Z., 2016. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2, 3–20
- Zheng, Y., Yi, C.G., Xia, W., Ding, T., Zhou, Z.Q., Han, Y. & Guo, S.Z., 2008. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121, 59–69.
- Zhou, K.X., Zhang, H.Y., Jin, O.Y., Feng, X.B., Yao, G.H., Hou, Y. & Sun, L.Y., 2008a. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice. *Cellular & Molecular Immunology*, 5, 417–424.
- Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M.W., Ivanov, I., Min, R., Vitorica, G.D., Shen, Y.L., Du, J.G., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., Ziegler, S.F. & Littman, D.R., 2008b. TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*, 453, 236–40.