

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Barbora Heřmánková

Studium vlivu imunosupresiv na interakci mezenchymálních kmenových
buněk s buňkami imunitního systému

Study of effect of immunosuppressive drugs on interaction of
mesenchymal stem cells with immune cells

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. za věnovaný čas a odborné vedení při zpracovávání diplomové práce a Mgr. Michaele Hájkové za ochotu a všestrannou pomoc. Mé poděkování patří také Prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc a ostatním členům laboratoře transplantační imunologie. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu při psaní této práce.

Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells) představují heterogenní populaci nehematopoetických kmenových buněk, která má multipotentní diferenciací potenciál. MSC můžeme najít v řadě tkání organismu, nejčastěji jsou izolovány z tukové tkáně a kostní dřeně. Díky svým imunomodulačním schopnostem jsou dobrým prostředkem pro léčbu autoimunitních onemocnění a zabránění odhojení štěpu nebo reakce štěpu proti hostiteli. V současnosti se k potlačení nežádoucích imunitních reakcí využívají imunosupresivní látky, které však mají řadu závažných vedlejších účinků. Použití MSC v terapii by umožnilo snížení dávek imunosupresiv a eliminaci nežádoucích účinků. Před uplatněním v léčbě je nezbytné prostudovat vztah mezi MSC a imunosupresivy a zjistit mechanismus jejich interakce.

Naším cílem bylo analyzovat interakci MSC a imunosupresiv a vliv na buňky imunitního systému. V experimentech jsme používali cyklosporin A a mykofenolát mofetil. Ověřili jsme změny v expresi povrchových molekul, produkci interleukinu 6 a metabolické aktivitě MSC po působení imunosupresiv. V organismu se MSC nevyskytují izolovaně, ale v kontaktu s buňkami imunitního systému, proto jsme studovali vliv imunosupresiv i na MSC v kultuře se splenocyty. Následně bylo analyzováno působení MSC a imunosupresiv na zastoupení populací splenocytů po vzájemné kultivaci. Naše výsledky ukazují, že MSC v kombinaci s imunosupresivy ovlivňují různé populace buněk imunitního systému. Po působení imunosupresiv byly detekovány změny v expresi povrchových molekul i rozpustných faktorů u MSC, které ovlivňují imunitní odpověď směrem k protizánětlivé.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, imunosupresiva, cyklosporin A, mykofenolát mofetil

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) represent a heterogeneous population of nonhematopoietic stem cells with multipotent differential potential. MSC can be isolated from various tissues of organism, the most common tissue are bone marrow or adipose tissue. MSC are good candidates for treatment of autoimmune diseases and possess the ability to prevent graft rejection or graft versus host disease. The immunosuppressive drugs are currently used for inhibition of unwanted immune reaction but they exhibit serious side effects. The use of MSC in therapy can reduce doses of immunosuppressive drugs and eliminate side effects. The study of MSC and immunosuppressant interactions should be detected before MSC can be used for clinical application.

We aimed to analyze the interaction between MSC and immunosuppressive drugs and their effect on immune cells. Cyclosporine A and mycophenolate mofetil were used in our research. We demonstrated changes in the expression of surface molecules, production of interleukin 6 and in metabolic activity of MSC after treatment with immunosuppressive drugs. MSC are in organism, in cooperation with the number of other cells. Therefore we studied MSC cocultured with splenocytes in the presence of immunosuppressive drugs. Our results show the effect of MSC and immunosuppressive drugs on different populations of immune cells. The changes in expression of surface molecules and soluble factors were detected after treatment with immunosuppressive drugs and MSC, the immune response was switched to anti-inflammatory direction.

Key words: mesenchymal stem cells, immunosuppressive drugs, cyclosporine A, mycophenolate mofetil

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	8
2. Úvod	10
3. Cíle diplomové práce	11
4. Literární přehled	12
4.1. Mezenchymální kmenové buňky	12
4.1.1. Fenotyp MSC	12
4.1.2. Výskyt a migrace MSC	12
4.1.3. Diferenční vlastnosti MSC	13
4.1.4. Receptory MSC	13
4.1.5. Imunoprivilegovanost MSC	14
4.1.6. Imunomodulační vlastnosti MSC	15
4.1.7. Vliv MSC na buňky imunitního systému	16
4.1.8. Využití MSC v terapii	18
4.2. Imunosupresiva	19
4.2.1. Cyklosporin A	20
4.2.2. Mykofenolát mofetil	21
4.3. MSC a imunosupresiva	21
4.4. Vliv imunosupresiv na vlastnosti MSC	22
4.4.1. Vliv imunosupresiv na diferenciaci MSC	23
4.4.2. Vliv imunosupresiv na viabilitu a proliferaci MSC	23
4.4.3. Vliv imunosupresiv na imunomodulační vlastnosti MSC	23
5. Materiál a metody	25
5.1. Zvířata	25
5.2. Roztoky a média	25
5.3. Použité technické vybavení	25
5.4. Použitý software	26
5.5. Izolace a kultivace MSC	27
5.6. Stimulace a ovlivnění buněk	27
5.7. Proliferační test	27
5.8. ELISA	28
5.9. Izolace RNA a reverzní transkripce	30

5.10. PCR	31
5.11. Real-time PCR.....	32
5.12. Průtoková cytometrie	33
5.13. Diferenciace MSC	37
5.14. Statistická analýza	37
6. Výsledky	38
6.1. Fenotyp MSC	38
6.1.1. Povrchové znaky.....	38
6.1.2. Diferenciace.....	39
6.2. Metabolická aktivita MSC	39
6.3. Produkce IL-6 MSC	41
6.4. Povrchové znaky MSC po ovlivnění imunopresivy	41
6.5. Expresní profil MSC po ovlivnění imunopresivy.....	45
6.6. Vliv imunopresiv na interakci MSC a splenocytů.....	46
6.6.1. Povrchové znaky MSC	47
6.6.2. Povrchové znaky splenocytů	49
6.6.3. Populace splenocytů	50
6.6.4. Produkce cytokinů splenocyty.....	54
7. Diskuze	56
8. Závěr	60
9. Přehled literatury.....	61

1. Seznam použitých zkratek

Alexa 700	Alexa Fluor 700
APC	allophycocyanine, alofykocyanin
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
ConA	concanavalin A, konkanavalin A
COX-2	cyklooxygenáza 2
DC	dendritic cells, dendritické buňky
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleid acid, deoxyribonukleová kyselina
FasL	Fas ligand
FCS	fetal calf serum, fetální telecí sérum
FGF	fibroblast growth factor, růstový faktor fibroblastů
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothiokianát
Foxp3	forkhead box proteins 3
GAPDH	glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GVHD	graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA-G	human leukocyte antigen-G, lidský leukocytární antigen G
HO-1	hem oxygenáza-1
ICAM-1	intracellular adhesive molecule-1, mezibuněčná adhezivní molekula-1
IDO	indolamin 2,3-dioxygenáza
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukin
IMPDH	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, inozin-5'-monofosfát dehydrogenáza
KGF	keratinocyte growth factor, růstový faktor keratinocytů
LPS	lipopolysacharid
MHC I	major histocompatibility complex class I, molekula hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy
MMF	mykofenolát mofetil
MSC	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky

NF-AT	nukleární faktor aktivovaných T buněk
nk	negativní kontrola
NK	natural killer, přirození zabíječi
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězcová reakce
PD-L1	programmed death ligand 1, ligand programované buněčné smrti
PE	phycoerythrin, fykoerytrin
PGE2	prostaglandin E2
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
ROR γ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medium 1640
SD	standard deviation, směrodatná odchylka
Spl	splenocyty
TGF- β	transforming growth factor β , transformující růstový faktor β
Th	T helper cell, pomocné T buňky
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor α , faktor nekrotizující nádory α
Treg	T regulační buňky
VCAM	vascular cell adhesion molekule, cévní adhezivní molekula
WST-1	water soluble tetrazolium 1, ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl 1

2. Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells) jsou multipotentní kmenové buňky vyskytující se v dospělém i fetálním organismu. V závislosti na různých faktorech jsou schopné diferenciací na řadu buněčných typů všech tří zárodečných linií. MSC mohou být izolovány například z kostní dřeně, tukové tkáně nebo pupečnickové krve, jejich izolace a následná kultivace není složitá. Jednou z jejich vlastností je schopnost migrace do míst poškození, reparace a regenerace tkání. MSC ale disponují i vlastností imunomodulace, dokážou inhibovat proliferaci nebo aktivaci buněk přirozené i adaptivní imunity. Jejich imunomodulační vlastnosti, které směřují imunitní odpověď na protizánětlivou, mají velký potenciál v klinickém využití.

V terapii jsou nyní k potlačení nežádoucích imunitních reakcí u autoimunitních chorob (například u revmatoidní artritidy, Crohnovy choroby, Myasthenie gravis) nebo k potlačení odhojení štěpu a reakci štěpu proti hostiteli (GVHD, graft versus host disease) po transplantacích využívány převážně imunosupresiva. Imunosupresivní látky mají ale řadu závažných nežádoucích účinků jako je poškození ledvin, zažívacího traktu nebo vyšší výskyt malignit a infekčních onemocnění. Použití MSC by mohlo umožnit snížení dávek podávaných imunosupresiv a tím eliminaci vedlejších účinků. Před uplatněním v léčbě je důležité prostudovat vztah mezi MSC a imunosupresivy a zjistit mechanismus jejich interakce. Jednotlivá imunosupresiva mají jiný mechanismus účinku a mohou na MSC působit odlišným způsobem. Pro klinické použití by mělo být vybráno imunosupresivum, které bude nejlépe kooperovat s imunomodulačními vlastnostmi MSC.

3. Cíle diplomové práce

K potlačení nežádoucích imunitních reakcí u autoimunitních chorob a předcházení odhojení štěpu nebo GVHD se v dnešní době využívají imunosupresivní látky. Celková imunosuprese pacienta způsobuje řadu nežádoucích účinků a větší náchylnost k infekčním onemocněním. MSC mají kromě jiných vlastností i schopnost imunomodulace, podporují přesmyk imunitní odpovědi na protizánětlivou. Jejich použití v terapii by umožnilo snížení koncentrací používaných imunosupresiv a eliminaci závažných nežádoucích účinků.

Cílem této práce bylo objasnění interakce mezi MSC a imunosupresivy a jejich vliv na buňky imunitního systému. Za tímto účelem jsme studovali působení imunosupresiv na samotné MSC nebo MSC kultivované se splenocyty. Předmětem studia byla také změna zastoupení jednotlivých populací splenocytů v kultuře s MSC a imunosupresivy.

4. Literární přehled

4.1. Mezenchymální kmenové buňky

Kmenové buňky můžeme rozdělit na embryonální kmenové buňky, které se diferencují do všech tří zárodečných linií a kmenové buňky dospělého organismu, které se nacházejí v téměř každé tkáni a pomáhají její regeneraci a opravám. MSC patří mezi kmenové buňky dospělého organismu, ale od ostatních se odlišují buněčným dělením. Nedochází u nich k rozdělení na jednu buňku s kmenovými vlastnostmi a druhou buňku diferencující se na příslušný buněčný typ. MSC také nemají svou jedinečnou niku jako ostatní kmenové buňky, nejspíše ji sdílí s jinými kmenovými buňkami přítomnými v místě jejich výskytu (Glennie et al. 2005).

MSC představují heterogenní populaci nehematopoetických kmenových buněk, která má multipotentní potenciál. V literatuře jsou občas označovány jako stromální kmenové buňky (Gronthos et al. 2003). Friedenstein a kol. (1970) poprvé popsali MSC jako buňky fibroblastického tvaru získané z kostní dřeně, které jsou schopné adheze k plastovému povrchu. Pojmenování mezenchymální kmenové buňky bylo použito až později (Caplan 1991).

4.1.1. Fenotyp MSC

Neexistuje žádný specifický marker k identifikaci MSC, proto se k definování MSC využívají kritéria stanovená Mezinárodní společností pro buněčnou terapii. MSC jsou charakterizovány diferenciačním potenciálem a souborem negativních a pozitivních markerů. Jedním z kritérií je také schopnost adheze MSC k plastu za standardních podmínek, této vlastnosti se využívá při jejich izolaci a kultivaci. Adheze MSC k plastovému povrchu umožňuje jejich oddělení od méně adhezivních buněk tkáně, ze které byly MSC získány (Dominici et al. 2006).

4.1.2. Výskyt a migrace MSC

MSC můžeme najít v řadě tkání organismu, nejčastěji jsou izolovány z tukové tkáně, kostní dřeně (Lee et al. 2004) a pupečnickové krve (Erices et al. 2000). V kostní dřeni představují MSC malou část buněk a svou produkcí růstových faktorů a diferenciačními schopnostmi zde pomáhají vytvářet niku hematopoetických kmenových buněk a podporují krvetvorbu (Muguruma et al. 2006). Tuková tkáň je

dostupnější zdroj MSC a je z ní možné získat větší množství MSC (Lee et al. 2004). Mezi další tkáně, ze kterých byly MSC izolovány, patří játra (Campagnoli et al. 2001), vlasový folikul (Shih et al. 2005), placenta (in't Anker et al. 2004) nebo amniotická tekutina (in't Anker et al. 2003).

Z místa výskytu mohou MSC migrovat do poškozených tkání krevním řečištěm, prostoupí skrz cévy do tkáně podobně jako imunitní buňky. V místě poškození MSC regenerují tkáň a podporují hojení. Migrace MSC je ovlivněna velkým množstvím chemotaktických faktorů. MSC na svém povrchu exprimují pro tyto faktory příslušné receptory (Ponte et al. 2007). Mezi další povrchové znaky MSC patří adhezivní molekuly jako cévní adhezivní molekula (VCAM, vascular cell adhesion molecule), mezibuněčná adhezivní molekula-1 (ICAM-1, intracellular adhesive molecule-1) a adhezivní molekula leukocytů-3 (Ruster et al. 2004). Nárůst koncentrace zánětlivých chemokinů v místě poranění je důležitým faktorem k migraci (Ponte et al. 2007; Tomchuck et al. 2008).

4.1.3. Diferenční vlastnosti MSC

MSC mohou primárně diferencovat na buňky mezodermálního původu jako například adipocyty, chondrocyty, osteocyty (Dominici et al. 2006) nebo kardiomyocyty (Toma et al. 2002). Později se ale ukázalo, že po ovlivnění příslušnými faktory mohou diferencovat na buňky všech tří zárodečných listů jako jsou například hepatocyty (Banas et al. 2007) nebo neurony (Tropel et al. 2006).

4.1.4. Receptory MSC

MSC na svém povrchu exprimují řadu receptorů, například receptory pro růstové faktory a cytokiny jako interleukin (IL) 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, interferon γ (IFN- γ), faktor nekrotizující nádory α (TNF- α , tumor necrosis factor α) a transformující růstový faktor β (TGF- β , transforming growth factor β) (Deans and Moseley 2000). Na povrchu MSC se nachází i receptory pro chemokiny, které jsou důležité pro migraci MSC, nejvíce exprimovanými jsou CXCR4, CX3CR1 a CXCR6. CX3CR1 se uplatňuje v adhezi MSC k endotelu v zánětlivém prostředí. CXCR4 je důležitý pro migraci buněk do kostní dřeně (Sordi et al. 2005). Wynn a kol. (2004) zjistili, že na povrchu MSC se nachází jen malá část CXCR4 a většina je uvnitř buněk. Na druhé straně jiná studie přinesla výsledky ukazující, že MSC neexprimují CXCR4 a mají na svém povrchu CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 a CCR10 (Von Lutichau et al.

2005). Přítomnost CCR1 a CCR7 na malé části MSC byla potvrzena i jinými autory (Sordi et al. 2005).

Dalšími receptory MSC jsou toll-like receptory (TLR). Bylo zjištěno, že lidské MSC izolované z kostní dřeně exprimují TLR1 až TLR6 (Liotta et al. 2008), MSC izolované z tukové tkáně exprimují navíc i TLR9 (Cho et al. 2006) a myší MSC mají TLR1 až TLR8 (Pevsner-Fischer et al. 2007). Nejvyšší exprese byla detekována u TLR3 a TLR4. TLR3 se nachází na membráně endozomu a jeho ligandem je dvouřetězcová ribonukleová kyselina (RNA, ribonucleic acid), TLR4 najdeme na plazmatické membráně a je aktivován lipopolysacharidem (LPS). Na základě odlišných vlastností MSC po aktivaci TLR3 a TLR4 byla stanovena existence dvou rozdílných fenotypů MSC1 a MSC2. Pokud se MSC aktivují agonistou TLR4, dojde ke vzniku fenotypu MSC1, který se uplatňuje v časně fázi zánětu. Na druhé straně vystavení působení agonisty TLR3 vede k polarizaci na MSC2, který je důležitý až v pozdní fázi regenerace tkáně (Waterman et al. 2010).

4.1.5. Imunoprivilegovanost MSC

MSCs mají nízkou expresi molekul hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy (MHC I, major histocompatibility complex class I), žádné glykoproteiny MHC II. třídy a na jejich povrchu nejsou přítomné ani kostimulační molekuly diferenciačního antigenu (CD, cluster of differentiation) 40, CD80, CD86. Vzhledem k imunoprivilegovanosti je možné v transplantacích aplikovat i alogenní MSC (Le Blanc et al. 2003).

MSC mohou měnit své funkce vzhledem k prostředí ve kterém se vyskytují. Pokud se MSC stimulují nízkou koncentrací IFN- γ , dochází k vyšší expresi obou typů MHC molekul, ale exprese kostimulačních molekul zůstává nezměněna a proliferace T lymfocytů stále potlačena (Krampera et al. 2006). Na druhé straně se MSC stimulované vysokou koncentrací IFN- γ chovají jako antigen prezentující buňky a mohou aktivovat proliferaci alogenních T lymfocytů (Stagg et al. 2006). Nízká exprese MHC I molekul by mohla vést k eliminaci MSC přirozenými zabíječi (NK, natural killer), k aktivaci NK buněk ale nedochází. Jedním z důvodů může být nepřítomnost potřebných cytokinů nebo exprese lidského leukocytárního antigenu G (HLA-G, human leukocyte antigen-G) (Selmani et al. 2008).

4.1.6. Imunomodulační vlastnosti MSC

MSC mohou inhibovat imunitní reakce jak prostřednictvím přímého mezibuněčného kontaktu, tak produkcí imunomodulačních molekul. Mezi molekuly zprostředkovávající mezibuněčný kontakt MSC a buněk imunitního systému patří například ligand programované buněčné smrti (PD-L1, programmed death ligand 1) a Fas ligand (FasL). Receptor pro molekulu PD-L1 je exprimován na aktivovaných T i B lymfocytech a hraje důležitou roli v negativní regulaci imunitní odpovědi (Augello et al. 2005). Po působení IFN- γ dojde ke zvýšení exprese PD-L1 na povrchu MSC (Sheng et al. 2008). PD-L1 je zodpovědný za snížení počtu Th17 buněk (Luz-Crawford et al. 2012) a naopak za nárůst populace T regulačních (Treg) buněk v *in vitro* modelu (Mokarizadeh et al. 2012). Interakce FasL s Fas receptorem je důležitá například v periferní toleranci nebo při ukončení imunitních reakcí. MSC prostřednictvím FasL mohou indukovat apoptotickou smrt u T buněk, na jejichž povrchu se nachází Fas receptor. Přítomnost FasL a rezistence k receptoru pro TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) umožňuje větší odolnost MSC k apoptóze (Akiyama et al. 2012).

MSC produkují cytokiny modulující imunitní odpověď jako je TGF- β (English et al. 2009), IL-6 (Djouad et al. 2007) a IL-10 (Qu et al. 2012). TGF- β negativně reguluje imunologické děje a je determinujícím cytokinem pro vznik T regulačních (Treg) buněk (Fu et al. 2004). Kromě cytokinů mohou MSC produkovat solubilní faktory jako enzym katabolizující tryptofan indolamin 2,3-dioxygenázu (IDO) (Meisel et al. 2004), NO produkovaný indukovatelnou syntázou oxidu dusnatého (Sato et al. 2007), prostaglandin E2 (PGE2) (English et al. 2009), hem oxygenázu-1 (HO-1) (Chabannes et al. 2007), HLA-G5 (Selmani et al. 2008). Dále se v imunomodulaci uplatňuje růstový faktor hepatocytů (HGF, hepatocyte growth factor) (Neuss et al. 2004), keratinocytů (KGF, keratinocyte growth factor), fibroblastů (FGF, fibroblast growth factor) (Liu et al. 2006), vaskulární endoteliální (Matsumoto et al. 2005), kolonií granulocytů a monocytů (Groh et al. 2005). Supresivní nebo imunomodulační účinky těchto látek byly ověřeny použitím blokujících protilátek. Některé molekuly jsou produkovány konstitutivně, ale u většiny se jejich exprese zvýší v zánětlivém prostředí (Ryan et al. 2007).

Mezi nejvíce studované solubilní molekuly produkované MSC patří IDO, PGE2, TGF- β , HGF, IL-10 a HLA-G5. Degradace tryptofanu pomocí IDO způsobí

inhibici proliferace imunitních buněk. Bylo prokázáno, že inhibice aktivity IDO vede k částečnému potlačení imunosupresivní aktivity MSC (Meisel et al. 2004). Jeho produkce není konstitutivní, ale je indukována IFN- γ , proto některé práce ukazují nezbytnost aktivace MSC pomocí IFN- γ (Krampera et al. 2006).

Přeměnu mastných kyselin na PGE2 zajišťuje cyklooxygenáza (COX) 1 a 2. PGE2 potlačuje produkci IL-2, IFN- γ a zvyšuje hladinu cyklického adenosinmonofosfátu. Jeho imunosupresivní účinky na T lymfocyty jsou předmětem mnoha studií, podílí se například na indukci Treg buněk. MSC produkují PGE2 konstitutivně a působení prozánětlivých faktorů jeho expresi zvyšuje (English et al. 2009). Další konstitutivně exprimovanou molekulou je HGF, který má společně s TGF- β synergistický účinek na imunosupresi buněk imunitního systému (Di Nicola et al. 2002).

Neklasická MHC I molekula HLA-G5 je jednou z imunomodulačních molekul MSC, receptor pro HLA-G5 je exprimován na NK buňkách, T buňkách a dendritických buňkách (DC, dendritic cells). HLA-G je zodpovědný za maternální toleranci plodu, nachází se na trofoblastu a inhibuje NK buněčnou aktivitu. Solubilní forma je produkována MSC po stimulaci IL-10 a může inhibovat cytotoxické T lymfocyty a NK buněčnou aktivitu (Nasef et al. 2007; Selmani et al. 2008).

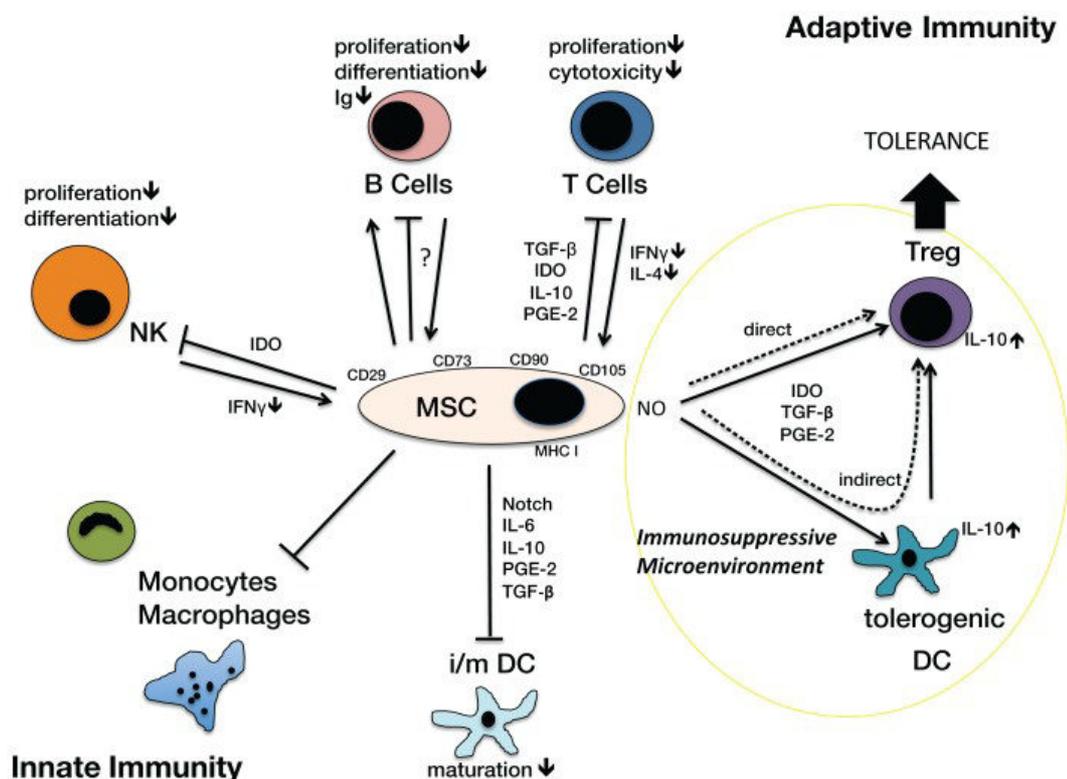
4.1.7. Vliv MSC na buňky imunitního systému

MSC inhibují proliferaci, aktivaci a funkci buněk imunitního systému. Působením na jeden typ buněk může dojít ke změně vlastností jiných imunitních buněk. MSC snižují aktivaci, maturaci, migraci DC a mění poměr mezi plazmacytoidními a myeloidními DC. Inhibice maturace DC má negativní vliv i na aktivaci T lymfocytů (Spaggiari et al. 2009). Kromě toho mohou MSC s T lymfocyty interagovat i přímo a inhibovat jejich proliferaci. MSC mění rovnováhu mezi pomocnými T buňkami 1 (Th1, T helper cell), Th17 a Th2, Treg buněk ve prospěch Th2 a Treg buněk. Dochází k přesmyku imunitní odpovědi na protizánětlivou, klesá produkce IFN- γ a naopak se zvýší IL-4 a IL-10 (Aggarwal and Pittenger 2005; Glennie et al. 2005).

MSC produkují velké množství TGF- β , který je ve vyšších hladinách determinačním faktorem pro Treg buňky, které jsou v organismu zodpovědné za udržení tolerance. Nižší koncentrace TGF- β společně s IL-6, IL-21 dává vznik prozánětlivým Th17 buňkám (Zhou et al. 2008b). U Th17 MSC inhibují produkci

prozánětlivých cytokinů jako IL-17 nebo IL-22 (Ghannam et al. 2010). Treg buňky mohou vznikat i po kontaktu T lymfocytů s nematurovanými DC, které jsou indukovány působením MSC (Maccario et al. 2005) (Obrázek 1).

MSC potlačují u B buněk proliferaci a mění produkci imunoglobulinů. Také mají vliv na snížení exprese receptorů pro chemokiny (CXCR4, CXCR5 a CCR7), inhibici migrace B buněk do sekundárních lymfoidních orgánů a diferenciaci na plazmatické buňky (Corcione et al. 2006). Bylo zjištěno, že interakce mezi MSC a makrofágy způsobí změnu fenotypu makrofágů z prozánětlivých M1 na alternativně aktivované makrofágy M2, které produkují IL-10 a podílí se na reparaci tkání. MSC indukují u makrofágů zvýšenou schopnost fagocytózy apoptotických buněk v místě zánětu a inhibují produkci cytokinů TNF- α , IL-12 (Kim and Hematti 2009). Kromě toho mají MSC vliv i na potlačení proliferace a cytotoxicity u NK buněk, po přímé interakci dochází ke snížení exprese povrchových receptorů na NK buňkách (Spaggiari et al. 2006). MSC působí i na neutrofilů, prostřednictvím IL-6 u nich inhibují apoptózu a oxidační vzplanutí (Raffaghello et al. 2008).



Obrázek 1: **Působení MSC na buňky imunitního systému.** MSC mají vliv na buňky vrozené i adaptivní imunity. Kromě přímého mezibuněčného kontaktu MSC produkují řadu solubilních imunomodulačních molekul například IDO, PGE-2, NO, TGF-β, IL-10. Působení MSC přes rozpustné faktory je pro většinu imunitních buněk inhibiční a MSC posouvají imunitní odpověď směrem k protizánětlivé a navození tolerance. Treg buňky mohou být indukovány jak přímo MSC, tak i nepřímo přes tolerogenní DC, které produkují více IL-10 (převzato z Plock et al. 2013).

4.1.8. Využití MSC v terapii

MSC mají potenciální využití v alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (Lazarus et al. 2005), prevenci rejekce štěpu (Bartholomew et al. 2002) a GVHD (Le Blanc et al. 2004) nebo léčbě autoimunitních chorob (Connick et al. 2012). V současné době probíhá řada klinických studií zabývajících se infuzí nebo transplantací MSC a jejich imunomodulačními vlastnostmi. Preklinické studie probíhají i v oblasti regenerace tkání (Phinney and Prockop 2007). MSC jsou využívány k regeneraci srdeční tkáně po ischemické mrtvici, po použití MSC byla zjištěna lepší obnova tkání (Lee et al. 2010).

Další skupinou onemocnění, kde mohou být vlastnosti MSC využity, jsou zánětlivá onemocnění střev – Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida (Duijvestein et al. 2010). MSC se využívají i k léčbě neurodegenerativních zánětlivých onemocnění například roztroušené sklerózy (Connick et al. 2012) nebo amyotrofické laterální sklerózy, která postihuje funkci motorických neuronů (Mazzini et al. 2010). Kromě imunomodulačních vlastností zde uplatňují svou produkci růstových faktorů podporujících regeneraci tkání a také schopnost diferenciaci na nervové buňky (Tropel et al. 2006). Terapie využívající MSC by mohla pomoci i v léčbě diabetu díky možnosti potlačení imunitní reakce proti Langerhansovým ostrůvkům slinivky břišní a regeneraci jejich buněk (Kunnathodi et al. 2013).

MSC mají využití i v potlačení GVHD, která je způsobena imunitními buňkami ze štěpu a bývá často rezistentní ke klasickým imunosupresivním látkám (Le Blanc et al. 2004). V první a druhé fázi klinických studií nebyly nalezeny žádné závažné vedlejší účinky MSC (Prasad et al. 2011). Uvažuje se také o možnosti navození tolerance po transplantaci orgánů, použití MSC by umožnilo snížení dávek v současnosti podávaných imunosupresiv. Například bylo prokázáno, že infuze MSC po transplantaci ledviny byla úspěšná a umožnila snížení dávky takrolimu na polovinu (Peng et al. 2013).

4.2. Imunosupresiva

Imunosupresivní látky jsou heterogenní skupinou léčiv potlačující imunitní reakce. Imunosupresiva se v klinice používají od poloviny 20. století, mezi první objevené patří kortizol a cyklofosfamid. V 70. letech 20. století byl velkým zlomem v transplantační terapii objev CsA, který výrazně zvýšil přežívání transplantátů. Dnes jsou imunosupresivní látky využívané k potlačení patologických imunitních reakcí, například k léčbě autoimunitních chorob a po transplantacích orgánů nebo kostní dřeně k prevenci odhojení štěpu a vzniku GVHD (Allison 2000).

Imunosupresiva můžeme rozdělit do několika skupin podle jejich mechanismu účinku. První skupinou jsou glukokortikoidy, které inhibují produkci cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5), NO, adhezivních molekul a indukují apoptózu lymfocytů. Jejich nevýhodou jsou velké nežádoucí účinky. Do druhé skupiny patří alkylační činidla jako cyklofosfamid, který způsobuje porušení deoxyribonukleové kyseliny (DNA, deoxyribonucleid acid) a apoptózu buněk (Allison 2000). Třetí skupina látek

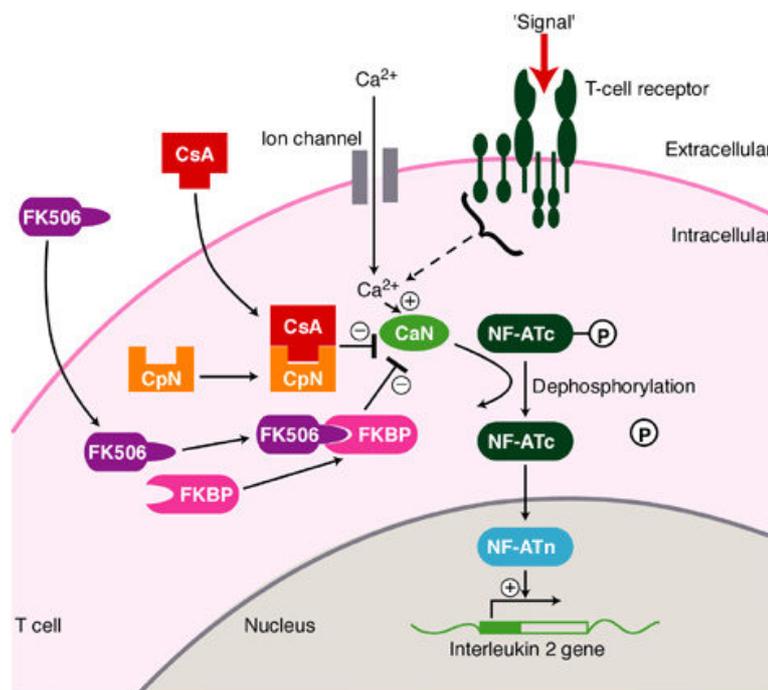
inhibuje kinázy a fosfatázy, zástupci jsou CsA, takrolimus (neboli FK-506) a rapamycin (neboli sirolimus). CsA a takrolimus inhibují kalcineurin a aktivaci lymfocytů. Rapamycin inhibuje kinázu mTOR (mammalian target of rapamycin) a signalizaci přes receptory pro růstové faktory (Halloran 2004; Matsuda and Koyasu 2000).

Do poslední skupiny patří látky blokující *de novo* syntézu purinů a pyrimidinů jako azathioprin, mykofenolát mofetil (MMF) a methotrexát. T buňky jsou více závislé na *de novo* syntéze purinů, proto jsou na tyto látky citlivější. Azathioprin je imidazolový derivát, který se štěpí na merkaptopurin. V buňkách je merkaptopurin přeměněn na purinové thioanalogy, které se inkorporují do DNA, dochází k inhibici biosyntézy nukleových kyselin a inhibici proliferace buněk (Halloran 2004). MMF inhibuje enzym inozin-5'-monofosfát dehydrogenázu (IMPDH, inosine-5'-monophosphate dehydrogenase) a syntézu purinů (Allison and Eugui 2000). Mehtotrexát je antagonistou kyseliny listové a blokuje enzym dihydrofolát reduktázu, která je důležitá v syntéze nukleotidů (Allison 2000).

4.2.1. Cyklosporin A

CsA je lipofilní cyklický peptid, který byl izolován z vláknité houby v 70. letech 20. století. Bylo zjištěno, že inhibuje aktivaci T lymfocytů dvěma způsoby. Na jedné straně se CsA váže na cyklofilin A, se kterým vytváří komplex zabraňující aktivaci fosfatázy kalcineurinu, která je závislá na kalmodulinu. Neaktivovaný kalcineurin neumožní defosforylaci a tím i aktivaci nukleárního faktoru aktivovaných T buněk (NF-AT). NF-AT nemůže migrovat do jádra a vázat se na promotory genů pro IL-2, IFN- γ a další (Obrázek 2). Na druhé straně CsA je nekompetitivním inhibitorem aktivity podjednotky proteazomu, což zabrání degradaci inhibitoru nukleárního faktoru κ B. Suprese nukleárního faktoru κ B vede k inhibici produkce IL-2 a IFN- γ . CsA také zvyšuje expresi TGF- β (Matsuda and Koyasu 2000).

Při dlouhodobém používání CsA bylo zjištěno kromě vyšší náchylnosti k bakteriálním, mykotickým a virovým infekcím i mnoho dalších závažných vedlejších účinků. Mezi nejvýznamnější patří chronické dysfunkce ledvin, poškození jater, neurotoxicita, trombogeneze, hypertenze a zvýšený výskyt malignit (Halloran 2004).



Obrázek 2: **Mechanismus působení CsA.** CsA se váže na cyklofilin (CpN) a tento komplex inhibuje fosfatázu kalcineurin (CaN), která je důležitá pro defosforylaci a aktivaci NF-AT. Neaktivovaný NF-AT nemigruje do jádra a nespouští expresi genu pro IL-2 (převzato a upraveno z Stepkowski 2000).

4.2.2. Mykofenolát mofetil

MMF je v těle přeměněn na kyselinu mykofenolovou, která inhibuje enzym IMPDH II, který je důležitý v *de novo* syntéze purinů lymfocytů. Kyselina mykofenolová byla objevena na konci 19. století a měla slabé antibiotické účinky, až v 80. letech 20. století byly objeveny její imunosupresivní vlastnosti. MMF inhibuje produkci IFN- γ a IL-6 (Allison and Eugui 2000). Mezi nejzávažnější vedlejší účinky patří poškození zažívacího traktu, zvýšení hladiny cholesterolu, neutropenie, anémie a karcinogenní účinky (Halloran 2004).

4.3. MSC a imunosupresiva

Porozumění interakce mezi MSC a imunosupresivy je důležité pro další klinické využití. Mnoho autorů ukazuje, že samotné MSC bez imunosupresiv mají dostatečný efekt na potlačení imunitních reakcí, na druhé straně to řada výsledků popírá. Zhou a kol. (2008) ukázali, že k prodloužení přežívání štěpu stačí pouze podání MSC bez imunosupresivních látek. MSC byly aplikovány před a po transplantaci

ve vysokých dávkách. Také v léčbě traumatického poškození mozku u myší bylo zjištěno, že v případě použití MSC není imunosuprese potřeba (Pischiutta et al. 2014). Naopak v myším modelu transplantace kostní dřeně měly alogenní MSC imunogenní vlastnosti (Nauta et al. 2006). K podobné situaci došlo při xenotransplantaci MSC do myokardu, kde bylo nutné využít imunosupresivní látky (Grinnemo et al. 2004). Alogenní MSC podané před transplantací srdce u potkanů působily imunogenně a došlo k aktivaci $CD4^+$ a $CD8^+$ lymfocytů, infiltraci buněk do štěpu a jeho odhojení. Při použití MSC společně s MMF byla infiltrace nižší, aktivované T buňky v sekundárních lymfoidních orgánech byly eliminovány a bylo zabráněno aktivaci buněk prezentujících antigen (Eggenhofer et al. 2011b). Interference aktivace endotelu a snížení množství ICAM-1 zabránila infiltraci lymfocytů a DC do štěpu (Glomsda et al. 2003).

Aplikace MSC s nízkou dávkou MMF indukuje dlouhodobé přežívání aloštěpu v potkaním modelu transplantace srdce (Popp et al. 2008). Pokud jsou ale MSC aplikovány s CsA k prodloužení přežívání srdečního transplantátu nedochází (Inoue et al. 2006). To je v rozporu s výsledky, kde kombinace lidských MSC a nízké dávky CsA byla více účinná než samotné MSC nebo vyšší dávka CsA (Shi et al. 2011).

Vzhledem k rozporuplným výsledkům je kombinace MSC a imunosupresiv zatím stále nutná. Je důležité vybrat takové imunosupresivum, které bude s MSC spolupracovat co nejefektivněji a je nezbytné zjistit mechanismus interakce MSC a imunosupresiv.

4.4. Vliv imunosupresiv na vlastnosti MSC

Molekulární cíle imunosupresivních látek jsou kromě lymfocytů přítomné i v řadě jiných buněk a mohou být příčinou některých závažných vedlejších účinků. V terapii jsou MSC často používány spolu s imunosupresivy, proto je důležité vědět, jakým způsobem imunosupresiva na MSC působí. Bylo zjištěno, že některá imunosupresiva na MSC vliv mají a jiná nikoli. Methotrexát a azathioprin vlastnosti MSC neovlivňují (Mancheno-Corvo et al. 2013), na rozdíl od MMF, CsA, takrolimu a rapamycinu (Hoogduijn et al. 2008).

4.4.1. Vliv imunosupresiv na diferenciaci MSC

Kalcineurin, který inhibují takrolimus a CsA, je exprimován v MSC a hraje roli v chondrogení diferenciaci (Tomita et al. 2002) a reguluje aktivitu osteoblastů (Hoogduijn et al. 2008). Vedlejšími účinky inhibitorů kalcineurinu je mimo jiné i ztráta kostní hmoty (Winslow et al. 2006). Rapamycin cílí na kinázu, která je také přítomná v MSC a ovlivňuje osteogenní diferenciaci (Hoogduijn et al. 2008; Singha et al. 2008). Rapamycin zvyšuje produkci lipidů při adipogenní diferenciaci (Hoogduijn et al. 2008) a je také důvodem časté hyperlipidémie při dlouhodobé léčbě rapamycinem (Houde et al. 2010).

Inhibitory kalcineurinu a MMF nemají vliv na adipogenní diferenciaci, ale během osteogenní diferenciaci snižují vápníková depozita v MSC. Využití MSC a inhibitorů kalcineurinu není vhodné například pro regeneraci srdečního svalu, protože mají negativní vliv na myogenní diferenciaci, vhodnější je použití MMF s antiproliferačním účinkem na MSC (Hoogduijn et al. 2008).

4.4.2. Vliv imunosupresiv na viabilitu a proliferaci MSC

Klinicky používané koncentrace imunosupresiv neindukují u MSC apoptózu. Hoogduijn a kol. (2008) izolovali MSC ze srdeční tkáně a inkubovali je s rapamycinem, takrolimem a MMF. Působení imunosupresiv po dobu 24 hodin viabilitu MSC neovlivnilo. Působení vyšší koncentrace takrolimu (100 ng/ml) po dobu 7 dní způsobilo velké snížení počtu živých MSC. Nejvyšší koncentrace MMF (100 µg/ml) měla podobný ale mírnější efekt. V nižších koncentracích (1 a 10 ng/ml) nemá takrolimus na proliferaci MSC vliv. Naopak MMF ve všech koncentracích (1 - 100 µg/ml) proliferaci redukuje, to je způsobeno silnou expresí IMPDH II v MSC. MMF inhibuje hlavně izoformu IMPDH II, která je kromě aktivovaných lymfocytů silně exprimovaná i v MSC, ostatní buňky exprimují izoformu I.

4.4.3. Vliv imunosupresiv na imunomodulační vlastnosti MSC

Inhibitory kalcineurinu blokují proliferaci lymfocytů již od nejnižší klinicky používané koncentrace, v přítomnosti MSC byl ale jejich vliv redukován a docházelo pouze k částečné inhibici buněk. Působení MMF společně s MSC naopak více inhibovalo proliferaci lymfocytů (Hoogduijn et al. 2008). MSC v kombinaci s imunosupresivy mají největší vliv na CD4⁺ lymfocyty, zatímco proliferaci

CD8⁺ lymfocytů neovlivní (Eggenhofer et al. 2011a). Hoogduijn a kol. (2008) testovali vliv imunosupresiv na inhibiční vlastnosti MSC. Inhibice směsné lymfocytární reakce byla zaznamenána pouze v případě preinkubace MSC s takrolimem, u MMF nebyl pozorován žádný efekt.

MSC potřebují k plné aktivaci svých imunosupresivních vlastností stimulaci prozánětlivými cytokiny jako je IFN- γ (Crop et al. 2010; Krampera et al. 2006). Bylo zjištěno, že MMF nemá vliv na produkci IFN- γ . V modelu transplantace srdce u potkanů MSC migrují do oblasti se zánětlivým prostředím a jsou zde aktivovány, po aktivaci MSC zvýší své imunosupresivní působení na lymfocyty. MMF neovlivňuje usídlení a aktivaci MSC, synergisticky působí až na supresi lymfocytů (Eggenhofer et al. 2011a). Na druhé straně inhibitory kalcineurinu zabrání produkci cytokinů a tak i aktivaci lidských MSC, proto CsA antagonizuje inhibiční efekt MSC (Buron et al. 2009).

Dále bylo ukázáno, že léčba pomocí MSC s nízkou koncentrací CsA urychlila odhojení transplantátu na potkaním modelu (Inoue et al. 2006). Také bylo ale zjištěno, že CsA má synergistický supresivní efekt s lidskými MSC na aktivaci cytotoxických lymfocytů *in vitro* (Maccario et al. 2005). MSC v kombinaci s nízkou dávkou CsA efektivně zabránily odhojení štěpu po transplantaci ledvin u potkanů (Zhang et al. 2007). Rozdílné výsledky mohou být způsobeny odlišnými kultivačními podmínkami a původem buněk. Pro klinické využití je proto důležité prostudovat vztah MSC a imunosupresiv, především jejich vliv na imunomodulační vlastnosti MSC.

5. Materiál a metody

5.1. Zvířata

Na všechny pokusy byly použity buňky izolované z myši inbredního kmene BALB/c. Používaly se pouze samice staré 2 – 4 měsíce, myši byly chované za standardních podmínek v chovech Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v. v. i..

5.2. Roztoky a média

MSC byly kultivovány v mediu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Do media bylo přidáno tepelně inaktivované fetální telecí sérum (FCS, fetal calf serum), (Sigma Aldrich) na výslednou koncentraci 10 %. Médium bylo doplněno o penicilin (100 U/ml, Sigma Aldrich), streptomycin (100 µg/ml, Sigma Aldrich), 2-merkapt ethanol (5×10^{-5} M, Serva, Heidelberg, Germany) a HEPES pufr (10mM, Sigma Aldrich). Výsledné medium je dále označováno jako 10% DMEM. Pokusy se splenocyty byly prováděny v mediu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), (Sigma Aldrich), které bylo obohaceno FCS na 10% koncentraci, penicilinem, streptomycinem a HEPES pufr. Toto kompletní medium je dále označováno jako 10% RPMI 1640.

Při přípravě buněk na analýzu pomocí průtokové cytometrie byl použit fosfátový pufr (phosphate buffered saline, PBS) připravovaný v ÚEM AV ČR, v. v. i. (0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,24g KH_2PO_4 a 1,44 g Na_2PO_4 , 1l destilované vody, pH upraveno na 7,2).

5.3. Použité technické vybavení

- Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Cycler PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., St. Bruno, Canada)
- iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Elektroforetická aparatura: PowerPac 300 (Bio-Rad), Hoefer HE33 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NY)
- Inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan)

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

5.4. Použitý software

- Ovládací software pro průtokový cytometr FACSDiva Software (BD)
- Vyhodnocovací software pro data získaná na průtokovém cytometru GateLogic308.3A (Inivai, Mentone Victoria, Australia)
- Ovládací software pro invertovaný mikroskop Olympus soft Imaging Solutions 31 (Olympus, Munster, Germany)
- Ovládací software pro spektrofotometr Revelation Quicklink (Dynex Technologies, Chantilly, VA)
- Ovládací software pro transluminator elektroforetických gelů Scion Image (Scion Corporation, Howston, TX)
- Ovládací software pro iCycler (Bio-Rad)
- Program GraphPad Prism5 pro statistické zpracování výsledků (GraphPad Software, La Jolla, CA)

5.5. Izolace a kultivace MSC

MSC byly izolovány z abdominálních tříselných tukových kapes, tuková tkáň byla po odebrání nastříhána a štěpena 1% kolagenózou (Sigma Aldrich) po dobu 1 hodiny v 37 °C. Ke konci inkubace byla suspenze buněk promíchána a po uplynutí inkubační doby byl obsah kádinky přenesen do zkumavky. Zkumavka byla doplněna PBS a centrifugována (8 minut, 170 g). Po centrifugaci byla opatrně odebrána vrchní vrstva PBS, aby na dně zůstal asi 1 ml nad peletou buněk. Peleta buněk byla resuspendována a zkumavka doplněna opět PBS a centrifugována. Supernatant byl znovu odebrán a buňky opět resuspendovány, zkumavka byla doplněna 10% DMEM a opět centrifugována. Tento krok byl zopakován ještě jednou a nakonec byla suspenze buněk přenesena do kultivační lahve (50 ml, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) a doplněna 10% DMEM na celkový objem 12 ml. Po 48 hodinách od izolace byly buňky opláchnuty předeřhřátým médiem, aby došlo k odstranění neadherentních buněk. MSC byly kultivovány při teplotě 37 °C a 5% atmosféře CO₂ po dobu 2 až 3 týdnů (3 až 5 pasáží), poté byly použity v pokusech.

5.6. Stimulace a ovlivnění buněk

MSC byly stimulovány IFN- γ (Immunotools, Friesoythe, Germany) v konečné koncentraci 10 ng/ml nebo LPS (Difco Laboratories, Detroit, MI) v konečné koncentraci 5 μ g/ml. Stimulace splenocytů byla provedena pomocí konkanavalinu A (ConA, concanavalin A), (Sigma Aldrich) v koncentraci 5 μ g/ml. Ve všech pokusech kromě testu proliferace byly použity vybrané koncentrace imunosupresiv, CsA (Sigma Aldrich) v koncentraci 0,05 μ g/ml a MMF (Sigma-Aldrich) v koncentraci 0,5 μ g/ml.

5.7. Proliferační test

Pomocí proliferačního testu byl zjištěn vliv imunosupresiv na metabolickou aktivitu MSC. MSC byly sterilně kultivovány v 10% DMEM v 96-jamkové destičce (Nunc, Roskilde, Danmark) po dobu 48 hodin nebo 7 dní při 37 °C. Do jamky bylo dáno $0,6 \times 10^4$ MSC pro kultivaci 48h a $0,2 \times 10^4$ pro kultivaci 7 dní. MSC byly bez stimulace nebo byly stimulovány LPS, IFN- γ . Kromě stimulace byly k MSC přidány různé koncentrace imunosupresiv CsA a MMF (0,05 μ g/ml, 0,5 μ g/ml a 5 μ g/ml). Inkubace probíhala v celkovém objemu 200 μ l a po 48 hodinách nebo 7 dnech byla do kultury přidána v poměru 1:10 tetrazoliová sůl 1 (WST-1, water soluble tetrazolium 1),

(Millipore, Billerica, MA). Metabolická aktivita buněk byla měřena po 2 hodinové inkubaci v termálním boxu pomocí spektrofotometru při 450 nm.

5.8. ELISA

Pomocí ELISA testu (enzyme-linked immunosorbent assay) byla měřena produkce cytokinů IL-6 a IL-17. V případě měření IL-6 bylo ve 48-jamkové destičce (Nunc) kultivováno $0,6 \times 10^5$ MSC, inkubace probíhala v celkovém objemu 600 μ l DMEM. Do třech jamek byl přidán IFN- γ , LPS nebo MSC nebyly stimulovány. Jedna jamka byla bez imunosupresiv, druhá s CsA a třetí s MMF. Po 48 hodinách byly z kultury odebrány supernatanty a zamraženy v -20 °C.

Produkce IL-17 byla měřena v kultuře MSC a splenocytů, ve 24-jamkové destičce bylo kultivováno $1,5 \times 10^6$ splenocytů a $0,5 \times 10^5$ MSC v celkovém objemu 1 ml. Splenocyty bez nebo za přítomnosti MSC byly stimulovány ConA. Jedna jamka byla bez imunosupresiv, druhá s CsA a třetí s MMF. Jako negativní kontrola sloužily nestimulované splenocyty. Po 72 hodinách byly z jednotlivých jamek odebrány supernatanty a zamraženy v -20 °C. Detekce cytokinů v supernatantech probíhala podle příslušných protokolů.

Pro zjištění produkce IL-6 byl použit následující postup:

- 1) do vysokoabsorpční 96-jamkové destičky (Costar, Cambridge, MA) přidat 50 μ l 0,1M roztoku NaHCO₃ (200 ml H₂O, 1,68 g NaHCO₃ s primární protilátkou proti IL-6 (Pharmigen, San Diego, CA) o koncentraci 0,76 μ g/ml
- 2) navázání primární protilátky přes noc ve 4 °C
- 3) druhý den dvakrát promýt promývacím roztokem (1 l PBS, 0,5 ml Tween-20)
- 4) zablokovat volný povrch jamek 150 μ l PBS s přidáním FCS v koncentraci 7,5% (blokovací roztok) při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin
- 5) čtyřikrát promýt promývacím roztokem
- 6) do jamek přidat po dvojicích 100 μ l analyzovaného vzorku, blanku (medium DMEM nebo RPMI 1640) a cytokinových standardů (Genzyme, Boston, MA)
- 7) inkubovat přes noc ve 4 °C

- 8) čtyřikrát promýt a přidat 100 μl blokovacího roztoku se sekundární protilátkou proti IL-6 (Pharmigen) v koncentraci 0,38 $\mu\text{g/ml}$, inkubace 1 hodinu při laboratorní teplotě
- 9) šestkrát promýt a do jamek přidat 100 μl avidin peroxidázy (2,5 $\mu\text{g/ml}$ v blokovacím roztoku) na 45 minut
- 10) osmkrát promýt, přidat 100 μl substrátu 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny (Sigma Aldrich) s peroxidem vodíku (120 mg 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny + 11 μl 30% H_2O_2 , 7,68 g kyseliny citronové, 400 ml H_2O , pH upraveno na 4,35), (Sigma Aldrich)

IL-17 byl detekován podle následujícího postupu:

- 1) přidat 100 μl primární protilátky proti IL-17 (R&D Systems, Mineapolis, MN) naředěné v PBS na koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ do vysokoabsorpční 96-jamkové destičky
- 2) navázání primární protilátky přes noc v laboratorní teplotě
- 3) druhý den třikrát promýt promývacím roztokem (1 l PBS, 0,5 ml Tween-20)
- 4) zablokovat volný povrch jamek 300 μl PBS s přidaným 1% hovězím sérovým albuminem (blokovací roztok) při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny
- 5) třikrát promýt promývacím roztokem
- 6) do jamek přidat po dvojicích 100 μl analyzovaného vzorku, blanku (medium DMEM nebo RPMI 1640) a cytokinových standardů (R&D Systems)
- 7) inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě
- 8) třikrát promýt a přidat 100 μl blokovacího roztoku se sekundární protilátkou proti IL-17 (R&D Systems) v koncentraci 0,4 $\mu\text{g/ml}$, inkubace 2 hodiny při laboratorní teplotě
- 9) třikrát promýt a do jamek přidat 100 μl streptavidin peroxidázy (R&D Systems) na 20 minut, inkubovat při pokojové teplotě na tmavém místě
- 10) třikrát promýt, přidat 100 μl substrátu (H_2O_2 a tetramethylbenzidín v poměru 1:1), (R&D Systems), inkubovat 20 minut při pokojové teplotě na tmavém místě
- 11) přidat 50 μl inhibičního roztoku (2 N H_2SO_4), (R&D Systems)

Substrát po enzymatické reakci vytváří v obou případech barevný produkt, míra jeho zbarvení je úměrná koncentraci cytokinu ve vzorku. Vzorky byly měřeny na spektrofotometru pomocí měřicího filtru nastaveného na hodnotu 405 nm pro IL-6 a 450 nm pro IL-17.

5.9. Izolace RNA a reverzní transkripce

Prvním krokem analýzy expresního profilu MSC ovlivněných imunopresivou je izolace RNA. Získaná RNA se přepisuje reverzní transkripcí do dvouřetězcové DNA. Buňky byly kultivovány v 6-jamkové destičce (Nunc) v množství $0,6 \times 10^5$ MSC na jamku v celkovém objemu 3 ml. V destičce byly MSC bez stimulace, MSC stimulované IFN- γ bez imunopresiv, s CsA a s MMF. Po 7 dnech byla izolována RNA pomocí TRI REAGENTu (MRC, Cincinnati, USA) podle následujícího postupu:

- 1) do zkumavek přidat chloroform v množství 1/5 objemu TRI REAGENTu, zkumavky stočit na centrifuze při nízké teplotě (15 minut, 12 000 g)
- 2) suspenze po stočení rozdělena na spodní fenolovou fázi a horní vodnou fázi s RNA, horní fázi opatrně přendat do nové zkumavky a přidat stejný objem izopropanolu
- 3) nechat 8 minutách stát při pokojové teplotě
- 4) centrifugace při nízké teplotě (8 minut, 12 000 g), supernatant odlit
- 5) opláchnout peletu RNA 75% ethanolem
- 6) ethanol odpipetovat a RNA sušit při 39 °C na stolní třepačce
- 7) po vysušení na led a rozpustit ve 20 μ l H₂O bez RNáz (Top-Bio, Praha, Česká republika) v 65 °C po dobu 5 minut

Pomocí reverzní transkripce byla RNA přepsána do komplementární DNA podle pokynů výrobce. K 1 μ g RNA byl přidán 1 μ l náhodných primerů hexamerů (Promega, Madison, WI), 1 μ l deoxynukleotidů (Invitex, Berlin, Germany) a doplněno PCR H₂O (Top-Bio) do objemu 13 μ l. Směs byla zahřátá v thermocyleru na 65 °C po dobu 5 minut a následně byla zchlazena na ledu. Dále bylo do zkumavky přidáno 4 μ l First-strand buffer, 1 μ l DDT, 0,5 μ l Rnasinu a 0,7 μ l SuperScript III RT (Invitrogen, Praha, Česká republika). Zkumavky byly vloženy do thermocyleru na program reverzní transkripce (10 minut 25 °C, 50 minut 50 °C, 15 minut 75 °C).

Po proběhnutí reverzní transkripce byla DNA použita na polymerázovou řetězcovou reakci (PCR, polymerase chain reaction).

5.10. PCR

Z DNA byl pomocí klasické PCR zjišťován expresní profil MSC ovlivněných imunosupresiv. Byla sledována exprese genů pro VCAM, ICAM, HGF, HO-1, FGF, KGF, PD-L1, Fas. Vzorky byly normalizovány pomocí glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH, glycerinaldehyd-3-phosphate dehydrogenase). Ke 2 μ l DNA byl přidán 1 μ l sense a 1 μ l antisense primerů (Tabulka 1) (Generi-Biotech, Hradec Králové, Česká republika), 6 μ l PPP Master Mix (Top-Bio) a 4,5 μ l PCR H₂O (Top-Bio).

Postup PCR byl následovný:

- 1) 2 minuty denaturace při 95 °C
- 2) 20 vteřin denaturace při 95 °C
- 3) 20 vteřin annealing při 60 °C
- 4) 20 vteřin polymerace při 72 °C
- 5) 10 minut finální syntéza při 72 °C

Kroky 2, 3 a 4 byly opakovány 24 – 35x. Vizualizace produktů PCR byla provedena pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu s využitím ethidiumbromidu.

Tabulka 1: **Seznam použitých primerů pro PCR.** S – sense, A - antisense

PRIMER	SEKVENCE
GAPDH S	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'
GAPDH A	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'
VCAM S	5'-GTCACGGTCAAGTGTTTGGC-3'
VCAM A	5'-AGATCCGGGGGAGATGTCAA-3'
ICAM S	5'-GTCCGCTGTGCTTTGAGAAC-3'
ICAM A	5'-TCGAGCTTTGGGATGGTAGC-3'
HGF S	5'-CACCCCTTGGGAGTATTGTG-3'
HGF A	5'-GGGACATCAGTCTCATTACAG-3'
HO-1 S	5'-CAGAACCAGTCTATGCCCC-3'
HO-1 A	5'-GCTGATCTGGGGTTCCCTC-3'
FGF S	5'-CGGCTCTACTGCAAGAACG-3'
FGF A	5'-TGCTTGGAGTTGTAGTTTGACG-3'
KGF S	5'-TCTCATCAATCTCCAGTTCACAA-3'
KGF A	5'-CTTGCGTTGATTGCTACTCCT-3'
PD-L1 S	5'-GGCCGAGGGTTATCCAGAAG-3'
PD-L1 A	5'-CTGCTAAGCCAGGAACCCTC-3'
Fas S	5'-GAAGGAGTACATGGACAAGA-3'
Fas A	5'-TGATATGCATCACTCTTCCC-3'

5.11. Real-time PCR

Kvantitativní real-time PCR byla provedena na iCycleru (Bio-Rad), relativní exprese byla stanovena vzhledem k GAPDH. Pro všechny experimenty byl využit SYBRGreen Supermix (Bio-Rad) a primery uvedené v Tabulce 2.

Postup PCR byl následovný:

- 1) 3 minuty denaturace při 95 °C
- 2) 10 vteřin denaturace při 95 °C
- 3) 20 vteřin annealing při 60 °C
- 4) 20 vteřin elongace při 72 °C

Fluorescenční data byla sbírána v každém cyklu po elongaci při 80 °C po dobu 5 vteřin. Data byla analyzována na detekční systému iCycler (Bio-Rad).

Tabulka 2: **Seznam použitých primerů pro real time PCR.** L – left, R - right

PRIMER	SEKVENCE
PD-L1 L	5'- TGCAGTTGAGCTGGCAAT-3'
PD-L1 R	5'- GGCTGGGTAGAAGGTGAGG-3'
COX-2 L	5'- AGCCCACCCCAAACACAGT-3'
COX-2 R	5'- AAATATGATCTGGATGTCAGCACATATT-3'
FasL L	5'- ACCGGTGGTATTTTTCATGG-3'
FasL R	5'- AGGCTTTGGTTGGTGAAGCTC-3'

5.12. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda založená na fluorescenčním značení povrchových nebo intracelulárních znaků. Monoklonální protilátky jsou konjugované s fluorochromy jako Alexa Fluor 700 (Alexa 700), alofykocyanin (APC, allophycocyanine), fluorescein isothiokianát (FITC, fluorescein isothiocyanate), fykoerytrin (PE, phycoerythrin). Bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých buněčných populací jak u MSC tak splenocytů. MSC byly kultivovány v množství $0,6 \times 10^5$ po dobu 7 dní a $0,5 \times 10^6$ po dobu 48 hodin v 6-jamkové destičce (Nunc). Do třech jamek byl přidán IFN- γ , LPS nebo MSC nebyly stimulovány. Jedna jamka byla bez imunopresiv, druhá s CsA a třetí s MMF. Kultivace probíhala v celkovém objemu 3 ml DMEM. Byly měřeny povrchové znaky CD80, CD86, CD54, CD106, CD90.2 a PD-L1 (tabulka 3).

Měření pomocí průtokové cytometrie probíhalo také na MSC, které byly v kultuře se splenocyty. Do 6-jamkové destičky bylo přidáno $0,6 \times 10^5$ MSC a $2,4 \times 10^6$ splenocytů a byly kultivovány v celkovém objemu 3 ml. Jako kontrolní vzorky byly nasazeny pouze samotné MSC bez splenocytů a imunopresiv, MSC se splenocyty bez imunopresiv a ConA. Splenocyty bez nebo za přítomnosti MSC byly stimulovány ConA. Do jedné jamky nebyly přidány imunopresiva, do druhé byl přidán MMF a do třetí CsA. Po 7 dnech byly analyzovány povrchové znaky CD80, CD86, CD54, CD106, MHC I, FasL, PD-L1 (tabulka 3).

Pro zjištění relativního zastoupení jednotlivých populací bylo inkubováno 2×10^6 splenocytů po dobu 48 hodin, případně $1,5 \times 10^6$ splenocytů po dobu 96 hodin ve 24-jamkové destičce (Nunc) v objemu 1 ml RPMI 1640. Splenocyty byly inkubovány s ConA bez nebo za přítomnosti MSC ($0,1 \times 10^6$ MSC 48 hodin,

0,5 x 10⁵ MSC 96 hodin). Jedna jamka byla bez imunosupresiv, druhá s CsA, třetí s MMF. Jako negativní kontrola byly použity nestimulované splenocyty. Pomocí průtokové cytometrie byly po 48 hodinách měřeny povrchové znaky CD80, CD86, CD40, CD19, CD69 a intracelulární cytokiny. Po 96 hodinách byly analyzovány povrchové znaky CD4, CD206, F4/80 a intracelulárně Foxp3 (forkhead box proteins 3) a ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t) (Tabulka 3).

Všechny vzorky byly z kultivační destičky přeneseny do mikrotitrační destičky (Nunc) v objemu 200 μ l, u MSC byl k uvolnění buněk použit 0,01M roztok kyseliny ethylendiamintetraoctové s DMEM v poměru 1:1. Další postup se lišil v přípravě povrchového značení a intracelulárního značení.

Povrchové značení:

- 1) centrifugace 3 minuty (170 g)
- 2) rozvolnění pelety buněk, přidání 10 μ l protilátky proti povrchovým znakům
- 3) inkubace ve 4 °C na tmavém místě po dobu 30 minut
- 4) 2 x promýt 200 μ l PBS
- 5) centrifugace 3 minuty (170 g)
- 6) přidat 200 μ l PBS
- 7) přidat 25 μ l Hoechst 33258

Současné barvení povrchových znaků a intracelulárních transkripčních faktorů:

- 1) centrifugace 3 minuty (170 g)
- 2) rozvolnění pelety buněk, přidání 10 μ l protilátky proti povrchovým znakům a kitu pro obarvení mrtvých buněk
- 3) inkubace ve 4 °C na tmavém místě po dobu 30 minut
- 4) 2 x promýt 200 μ l PBS
- 5) centrifugace 3 minuty (170 g)
- 6) rozvolnění pelety buněk, přidání 100 μ l fixačního/permeabilizačního pufru - naředěný 1:3 v ředícím roztoku (eBioscience, San Diego, CA)
- 7) inkubace ve 4 °C na tmavém místě po dobu 30 minut
- 8) 2 x promýt 200 μ l permeabilizačního pufru – naředěný 1:10 destilovanou vodou (eBioscience)
- 9) centrifugace 4 minuty (230 g)
- 10) rozvolnění pelety buněk, přidání 10 μ l protilátky proti intracelulárním znakům (naředěno v permeabilizačním pufru)

- 11) inkubace ve 4 °C na tmavém místě po dobu 30 minut
- 12) 2 x promýt 200 µl permeabilizačního pufru
- 13) centrifugace 4 minuty (230 g)
- 14) přidat 200 µl permeabilizačního pufru

Při měření intracelulárních cytokinů musí nejdříve dojít k restimulaci po dobu 4 hodin ve 37 °C. Z 24-jamkové destičky bylo odebráno 700 µl a do zbylých 300 µl byl přidán ionomycin (eBioscience) v konečné koncentraci 0,5 µg/ml, forbol-12-myristát-13-acetát (eBioscience) v konečné koncentraci 20 ng/ml a brefeldin A (eBioscience) v konečné koncentraci 7,5 µg/ml. Po 4 hodinách byly buňky obarveny podle následujícího postupu:

- 1) centrifugace 3 minuty (170 g)
- 2) rozvolnění pelety buněk, přidání 10 µl protilátky proti povrchovým znakům a kitu pro obarvení mrtvých buněk
- 3) inkubace ve 4 °C na tmavém místě po dobu 30 minut
- 4) 2 x promýt 200 µl PBS
- 5) centrifugace 3 minuty (170 g)
- 6) rozvolnění pelety buněk, přidání 100 µl IC fixačního pufru (eBioscience)
- 7) inkubace v laboratorní teplotě na tmavém místě po dobu 30 minut
- 8) 2 x promýt 200 µl permeabilizačního pufru – naředěný 1:10 destilovanou vodou (eBioscience)
- 9) centrifugace 4 minuty (230 g)
- 10) rozvolnění pelety buněk, přidání 10 µl protilátky proti intracelulárním znakům (naředěno v permeabilizačním pufru)
- 11) inkubace v laboratorní teplotě na tmavém místě po dobu 30 minut
- 12) 2 x promýt 200 µl permeabilizačního pufru
- 13) centrifugace 4 minuty (230 g)
- 14) přidat 200 µl permeabilizačního pufru

Všechny vzorky byly měřeny pomocí průtokového cytometru LSR II.

Tabulka 3: Seznam použitých protilátek.

detekovaný znak	konjugovaný fluorochrom	koncentrace (mg/ml)	výrobce	používané ředění	značení
CD4	FITC	0,5	eBioscience	1:55	povrchové
CD19	FITC	0,5	BioLegend	1:50	povrchové
CD25	APC	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
CD31	PE	0,5	BD	1:50	povrchové
CD34	PE	0,2	BD	1:50	povrchové
CD40	PE	0,2	eBioscience	1:50	povrchové
CD44	FITC	0,5	BD	1:55	povrchové
CD45	PE	0,2	BioLegend	1:60	povrchové
CD45	FITC	0,5	BioLegend	1:60	povrchové
CD45	APC	0,2	BioLegend	1:60	povrchové
CD45	Alexa 700	0,5	BioLegend	1:60	povrchové
CD54	APC	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
CD69	PE	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
CD80	FITC	0,5	BioLegend	1:50	povrchové
CD86	PE	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
CD90.2	PE	0,5	BioLegend	1:50	povrchové
CD105	PE	0,2	eBioscience	1:50	povrchové
CD106	APC	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
CD206	FITC	0,5	BioLegend	1:50	povrchové
F4/80	PE	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
FasL	PE	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
MHC I	FITC	0,5	eBioscience	1:50	povrchové
PD-L1	APC	0,2	BioLegend	1:50	povrchové
Foxp3	PE	0,2	eBioscience	1:50	intracelulární
ROR γ t	PE	0,2	eBioscience	1:45	intracelulární
IL-6	APC	0,2	eBioscience	1:70	intracelulární
IL-10	APC	0,2	BioLegend	1:70	intracelulární

5.13. Diferenciace MSC

MSC byly kultivovány ve 24-jamkové deštičce (Nunc) v přítomnosti osteogenního a adipogenního činidla přibližně 2 týdny.

Při adipogenní diferenciaci bylo k MSC přidáno adipogenní medium, které obsahovalo 10 ml 10% DMEM, 1 μ l dexametazonu, 10 μ l 3-izobuthyl-1-methylxanthinu, 10 μ l inzulinu, 100 μ l indometacinu. MSC diferencované na adipocyty byly nejdříve fixovány formaldehydem, pak důkladně opláchnuty 60% izopropanolem a usušeny. Tukové vakuoly byly poté obarveny naředěním roztokem Oil Red (0,7 g Oil Red O na 200 ml izopropanolu) v poměru 6:4 destilovanou vodou.

Osteogenní činidlo obsahovalo na 10 ml 10% DMEM 1 μ l dexametazonu, 200 μ l pentahydrátu disodné soli glycerolfosfátu a 5 μ l L-askorbové kyseliny. Depozita kalcia u produktů osteogenní diferenciace byly barveny Alizarin Red S (4g Alizarin Red S na 200 ml destilované vody, pH = 4,1 – 4,3).

5.14. Statistická analýza

Prezentovaná data představují aritmetický průměr a směrodatnou odchylku (SD, standard deviation). Statistická signifikace byla stanovena pomocí ANOVA testu. Hodnoty * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ a *** $P \leq 0,001$ byly považovány za signifikantní.

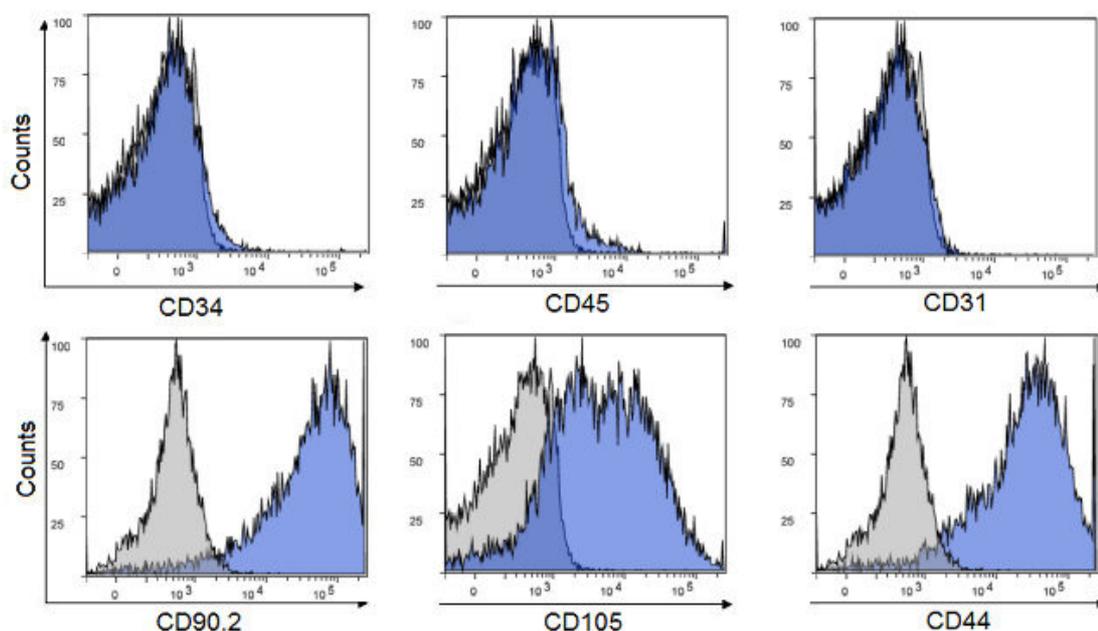
6. Výsledky

6.1. Fenotyp MSC

Populace MSC je stanovována podle definice Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii pomocí tří kritérií. MSC musí být za standardních kultivačních podmínek adhezivní k plastu. Dále musí exprimovat CD105, CD73, CD105 a CD90 a naopak by u nich nemělo docházet k expresi markerů typických pro hematopoetické kmenové buňky jako například CD31, CD34, CD45 nebo CD11b. Třetím kritériem je schopnost diferenciaci na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty (Dominici et al. 2006). Tato kritéria byla experimentálně ověřena.

6.1.1. Povrchové znaky

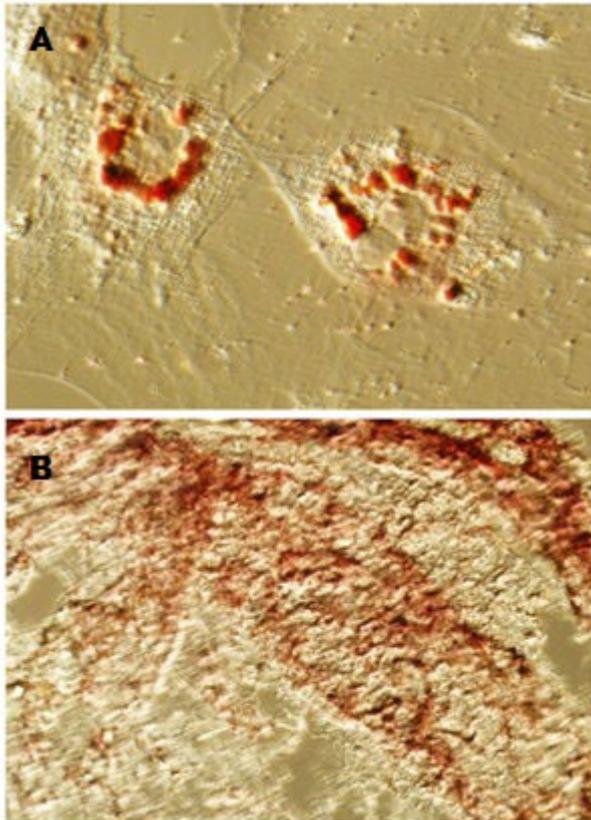
Pro stanovení povrchových znaků MSC byla použita analýza na průtokovém cytometru, byly použity protilátky proti hematopoetickým znakům CD31, CD34, CD45 a markerům typickým pro MSC CD90.2, CD44, CD105 (Obrázek 3).



Obrázek 3: **Stanovení povrchových znaků MSC.** Pomocí průtokové cytometrie byla u MSC analyzována nepřítomnost znaků CD34, CD45, CD31 a přítomnost pozitivních znaků CD90.2, CD105, CD44.

6.1.2. Diferenciace

MSC jsou schopné po ovlivnění příslušnými faktory diferencovat na řadu buněčných typů mezodermálního původu. Po kultivaci MSC s osteogenním a adipogenním činidlem došlo k jejich diferenciaci na osteocyty a adipocyty (Obrázek 4).

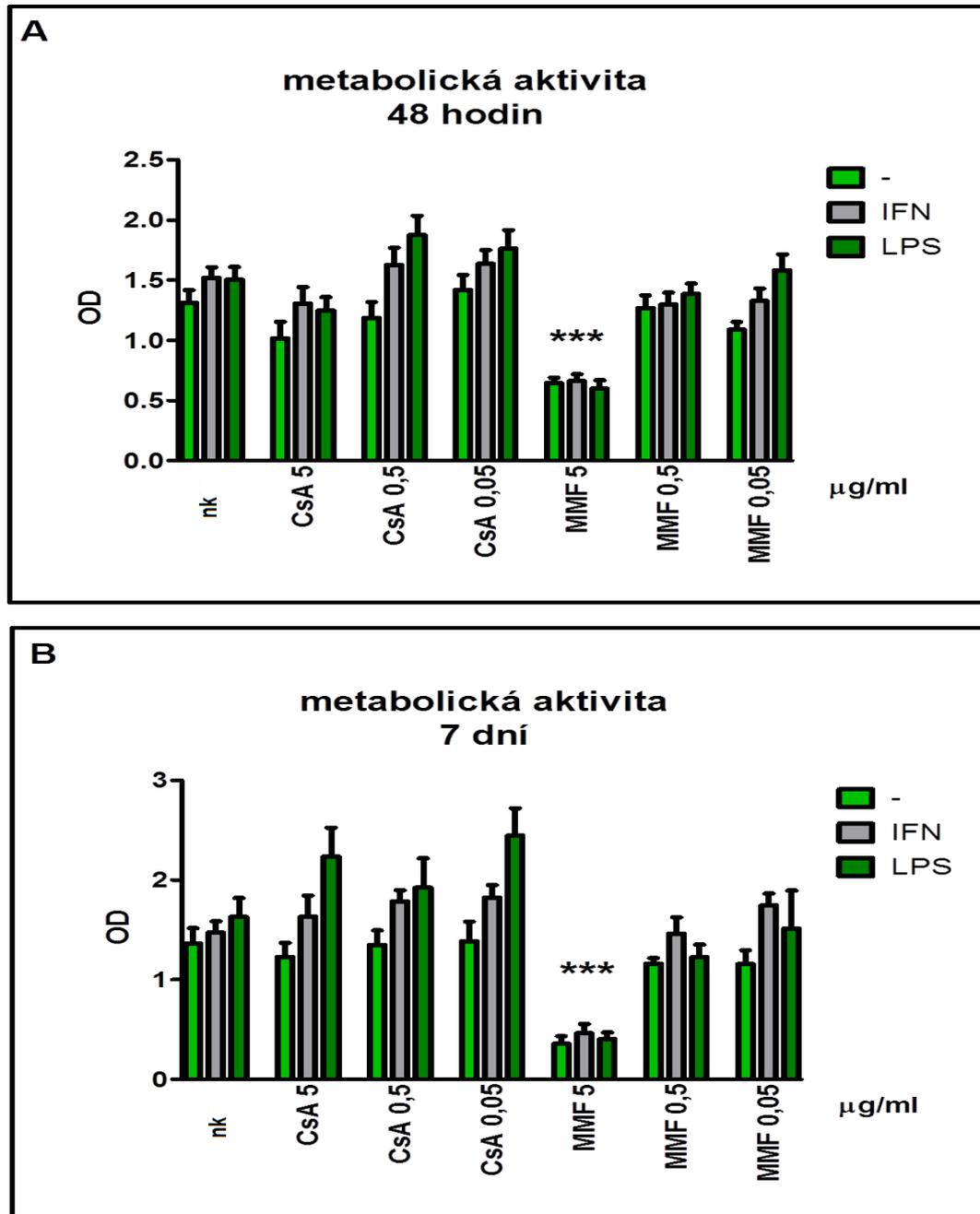


Obrázek 4: **Adipogenní a osteogenní diferenciace.** MSC diferencované na adipocyty - tukové vakuoly obarvené Oil Red (A) a osteocyty – depozita kalcia obarvena Alizarin Red (B).

6.2. Metabolická aktivita MSC

Prvním cílem bylo zjistit vliv imunopresiv na metabolickou aktivitu MSC. Nejdříve byla stanovena škála koncentrací imunopresiv od 0,05 $\mu\text{g/ml}$ do 5 $\mu\text{g/ml}$ vycházející z koncentrací využívaných v terapii. Pomocí WST byla měřena metabolická aktivita MSC po ovlivnění různými koncentracemi CsA a MMF (5; 0,5; 0,05 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 48 hodin a 7 dní. V testech byly využity jak nestimulované MSC, tak MSC stimulované IFN- γ a LPS. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že na snížení metabolické aktivity u nestimulovaných i stimulovaných MSC má vliv pouze nejvyšší koncentrace MMF (Obrázek 5A). K výraznějšímu snížení dochází při ovlivnění MSC

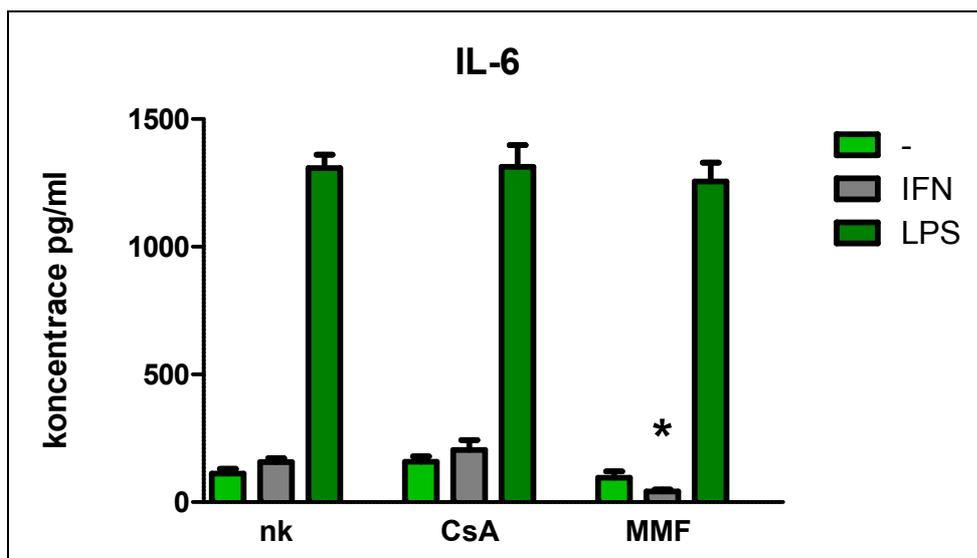
po dobu 7 dní (Obrázek 5B). Pro další pokusy byly využívány pouze koncentrace MMF 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a CsA 0,05 $\mu\text{g/ml}$, které nemají na metabolickou aktivitu MSC zásadní vliv.



Obrázek 5: Vliv imunopresiv na metabolickou aktivitu MSC. Metabolická aktivita byla měřena u nestimulovaných MSC (-) a MSC stimulovaných pomocí LPS nebo IFN- γ , které byly ovlivněny CsA a MMF v koncentracích 5; 0,5 nebo 0,05 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 48 hodin (A) a 7 dní (B). K detekci byla použita přeměna substrátu WST na barevný produkt a výsledek měřen spektrofotometricky. nk – negativní kontrola, MSC bez imunopresiv. Data představují průměry a SD ze tří nezávislých pokusů (***P < 0,001 oproti nk).

6.3. Produkce IL-6 MSC

Jedním z cytokinů produkovaných MSC je IL-6, který je produkován ve větším množství až po stimulaci MSC pomocí LPS. Po ovlivnění stimulovaných i nestimulovaných MSC MMF nebo CsA bylo zjištěno, že k nevýraznému poklesu produkce IL-6 dochází po působení MMF a to především u MSC stimulovaných IFN- γ (Obrázek 6).

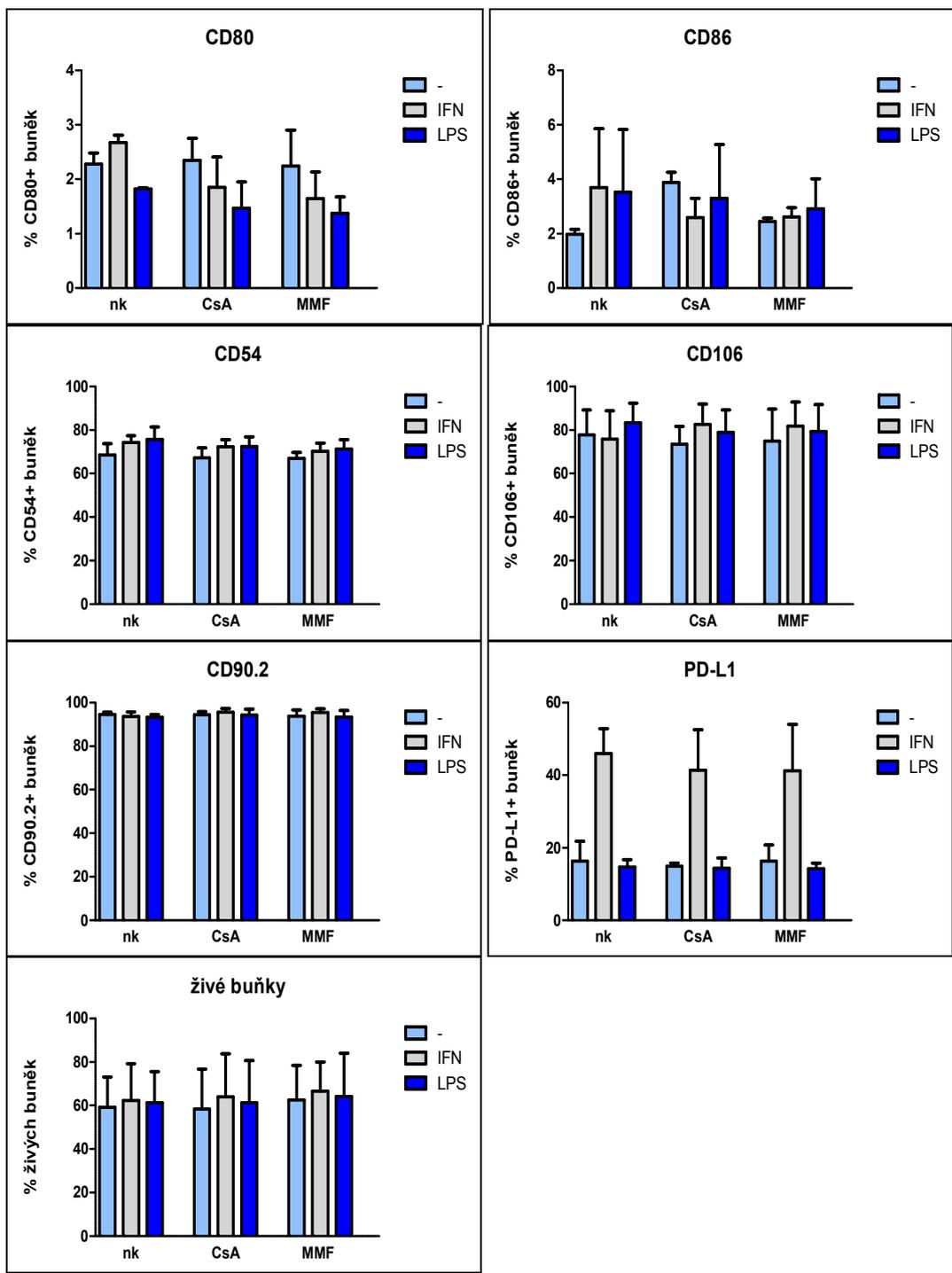


Obrázek 6: **Produkce IL-6 MSC.** IL-6 byl stanoven pomocí ELISA testu ze supernatantů nestimulovaných MSC (-) a stimulovaných MSC pomocí LPS nebo IFN- γ , které byly ovlivněny CsA (0,05 μ g/ml) a MMF (0,5 μ g/ml). nk – negativní kontrola, MSC bez imunosupresiv. Data představují průměry a SD ze tří nezávislých pokusů (*P < 0,05 oproti nk).

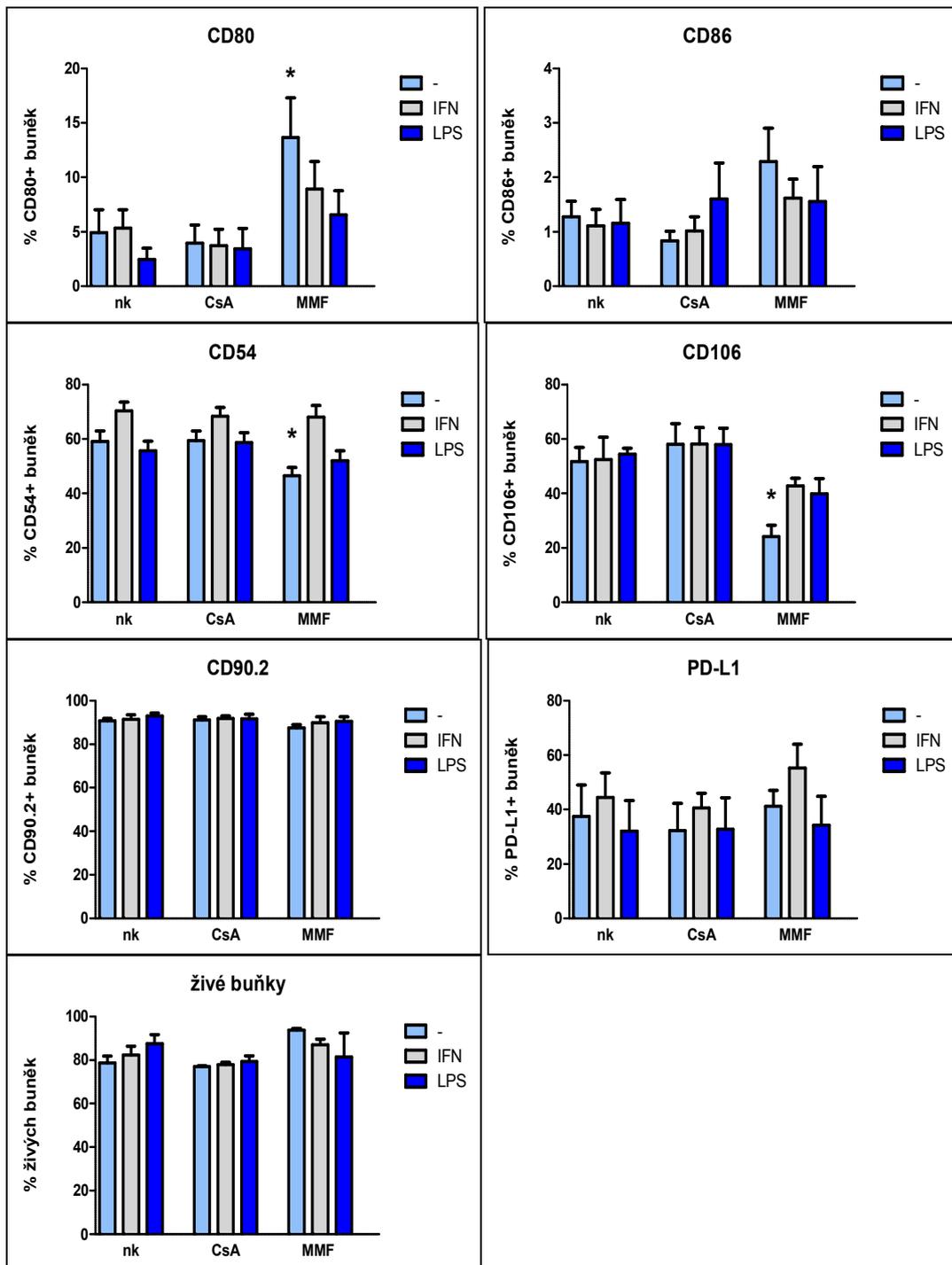
6.4. Povrchové znaky MSC po ovlivnění imunosupresivy

Jedním z cílů bylo zjistit, jestli imunosupresiva ovlivňují expresi povrchových znaků MSC. Nestimulované i stimulované MSC byly kultivovány za přítomnosti CsA a MMF, následně byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Byla testována exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, adhezivních molekul CD54 (ICAM-1) a CD106 (VCAM-1), PD-L1 a markeru MSC CD90.2. U MSC ovlivněných imunosupresivy po dobu 48 hodin (Obrázek 7) nebyla ve srovnání s kontrolou (neovlivněnými MSC) zjištěna změna v žádném z vybraných povrchových znaků. Vzhledem k těmto výsledkům byla doba působení imunosupresiv na MSC prodloužena na 7 dní a byly sledovány stejné znaky (Obrázek 8). U prodloužené kultivace došlo

ke změnám fenotypu MSC ovlivněných MMF, u kterých se oproti neovlivněným MSC zvýšila exprese kostimulačních molekul CD80, CD86 a naopak významně snížila exprese adhezivních molekul CD106 a CD54 u nestimulovaných MSC. Po ovlivnění MMF také došlo k nesignifikantnímu zvýšení exprese molekuly PD-L1 u MSC stimulovaných IFN- γ .



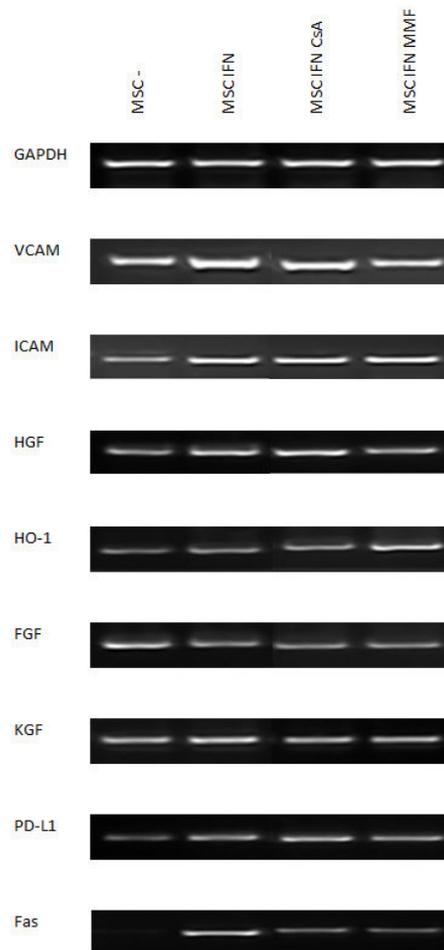
Obrázek 7: **Expresa povrchových znaků MSC po působení imunosupresiv 48 hodin.** Nestimulované MSC (-) a stimulované MSC (IFN- γ nebo LPS) byly ovlivněny po dobu 48 hodin CsA (0,05 $\mu\text{g/ml}$) nebo MMF (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Relativní zastoupení povrchových molekul bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. nk – negativní kontrola, MSC bez imunosupresiv. Data představují průměry a SD ze dvou nezávislých pokusů.



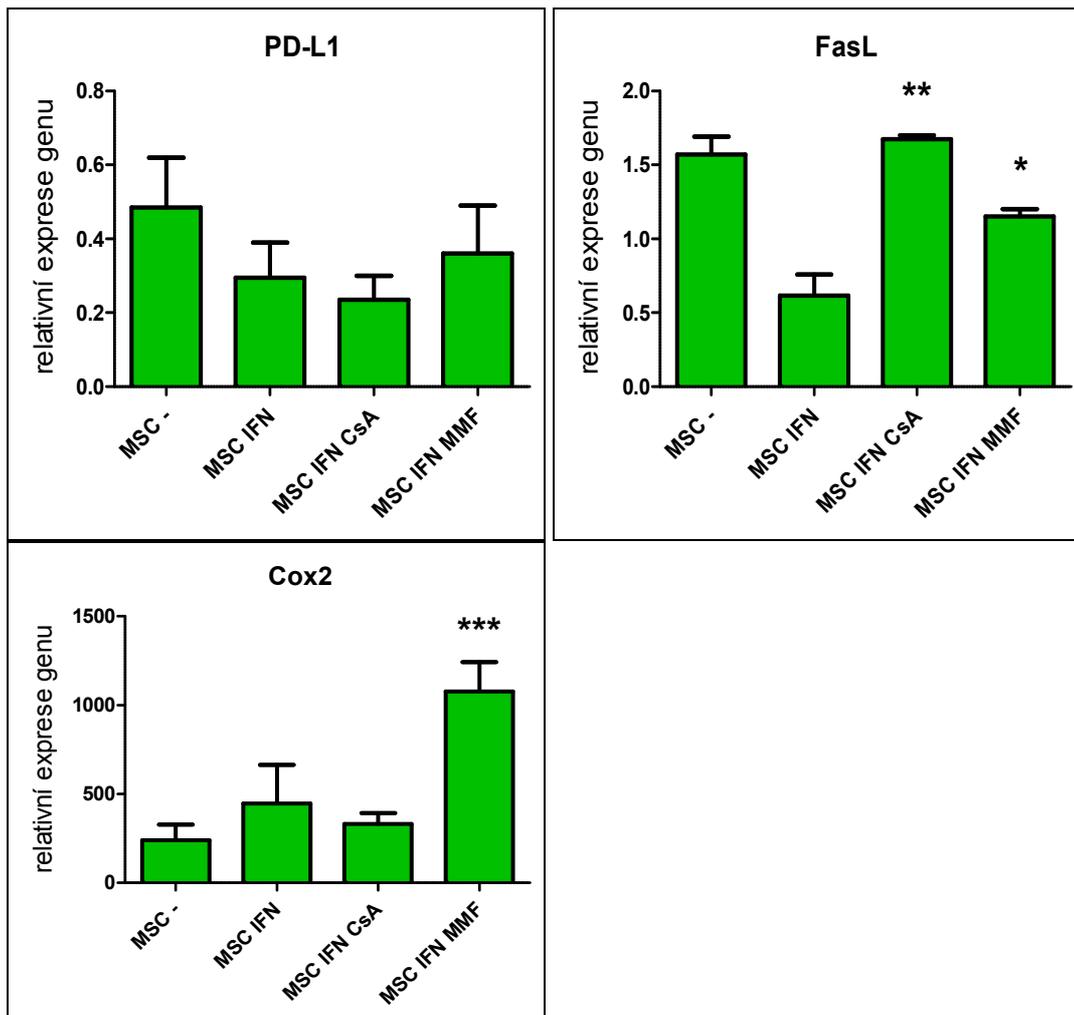
Obrázek 8: Expresse povrchových znaků MSC po působení immunosupresiv 7 dní. Nestimulované MSC (-) a stimulované MSC (IFN- γ nebo LPS) byly ovlivněny po dobu 7 dní CsA (0,05 μ g/ml) nebo MMF (0,5 μ g/ml). Relativní zastoupení povrchových molekul bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. nk – negativní kontrola, MSC bez immunosupresiv. Data představují průměry a SD ze tří nezávislých pokusů (*P < 0,05 oproti nk).

6.5. Expresní profil MSC po ovlivnění imunosupresivy

Výsledky z průtokové cytometrie byly doplněny o analýzu pomocí PCR a real-time PCR u MSC stimulovaných IFN- γ a ovlivněných CsA nebo MMF po dobu 7 dní. Byla stanovena exprese genů pro vybrané markery, které mají imunomodulační vliv na buňky. U exprese vybraných genů nebyly pozorovány žádné významné změny (Obrázek 9). Výsledky získané pomocí real-time PCR ukazují zvýšení exprese genů pro FasL po působení CsA i MMF, snížení PD-L1 u MSC s CsA a naopak zvýšení u MSC s MMF oproti MSC stimulovaným pouze IFN- γ bez imunosupresiv. Největší rozdíl byl zjištěn u exprese COX-2, kde po působení MMF na MSC stimulované IFN- γ došlo k velkému zvýšení exprese oproti kontrole (Obrázek 10).



Obrázek 9: **Expese genů u MSC po ovlivnění imunosupresivy po dobu 7 dní.** Pomocí PCR byl porovnán vliv imunosupresiv u MSC stimulovaných IFN- γ na expresi genů pro VCAM, ICAM, HGF, HO-1, FGF, KGF, COX-2, PD-L1 a Fas. Jako kontrola byla použita exprese genů pro GAPDH. Data ukazují jeden reprezentativní pokus ze dvou nezávislých opakování.



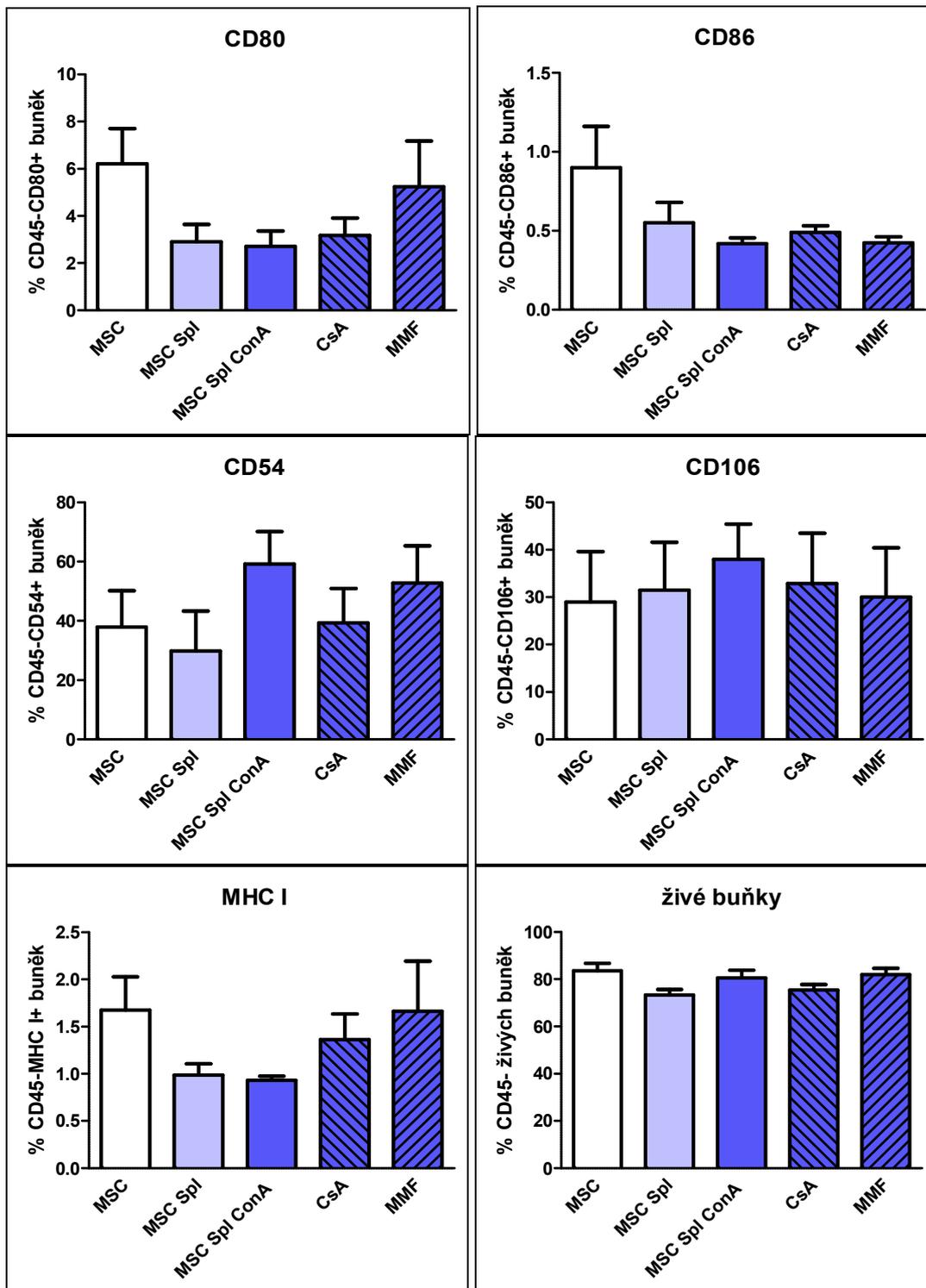
Obrázek 10: Exprese genů pro FasL, PD-L1 a COX-2 po ovlivnění imunosupresivy podobu 7 dní. Pomocí real-time PCR byl porovnán vliv imunosupresiv u MSC stimulovaných IFN- γ na expresi genů pro FasL, PD-L1 a COX-2. Jako kontrola byla použita exprese genu pro GAPDH. Data představují průměry a SD ze dvou pokusů (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ oproti MSC IFN- γ).

6.6. Vliv imunosupresiv na interakci MSC a splenocytů

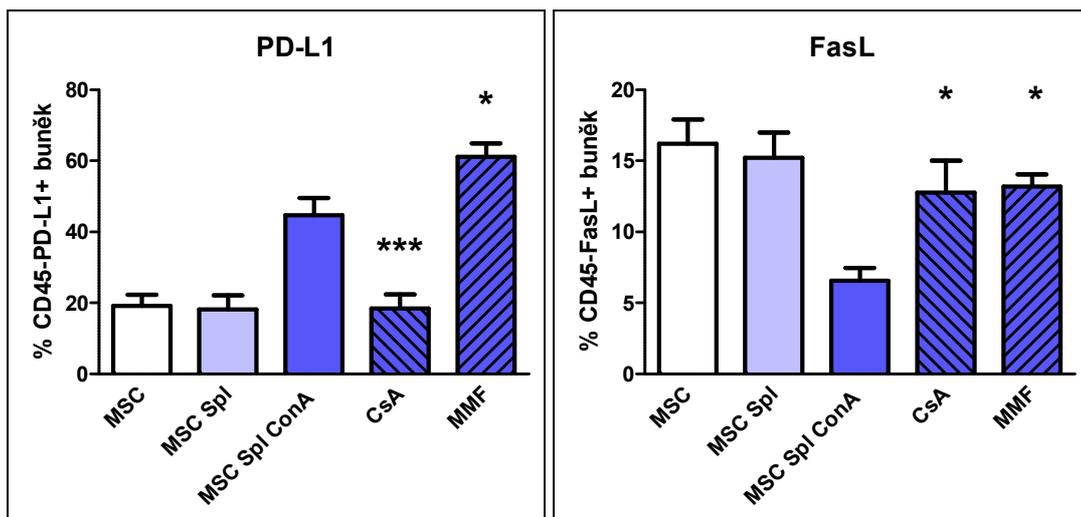
MSC mají imunomodulační vlastnosti a dokážou inhibovat proliferaci a aktivaci buněk imunitního systému. V kokultivačním systému MSC, splenocytů a imunosupresiv byly v porovnání s kulturou splenocytů a imunosupresiv detekovány změny v expresi povrchových molekul, zastoupení jednotlivých populací buněk a produkci cytokinů. Bylo zjišťováno, zda se mění exprese molekul MSC v kultuře se splenocyty oproti samotným kultivovaným MSC a následně jak působí MSC na expresi jednotlivých molekul splenocytů.

6.6.1. Povrchové znaky MSC

Po kultivaci MSC se splenocyty a imunosupresivy po dobu 7 dní byly pomocí průtokové cytometrie analyzovány kostimulační molekuly CD80 a CD86, adhezivní molekuly CD54 a CD106 a dále PD-L1, MHC I, FasL. V případě kostimulačních a adhezivních molekul jsme potvrdili stejnou tendenci jako u stimulace samotných MSC (Obrázek 11). Výsledky ukazují, že exprese PD-L1 se oproti kontrole signifikantně zvýšila u MSC kultivovaných se stimulovanými splenocyty a MMF, naopak signifikantně snížila v přítomnosti CsA. Další změna v expresi byla pozorována u FasL, kde došlo k signifikantnímu zvýšení po působení obou imunosupresiv (Obrázek 12).



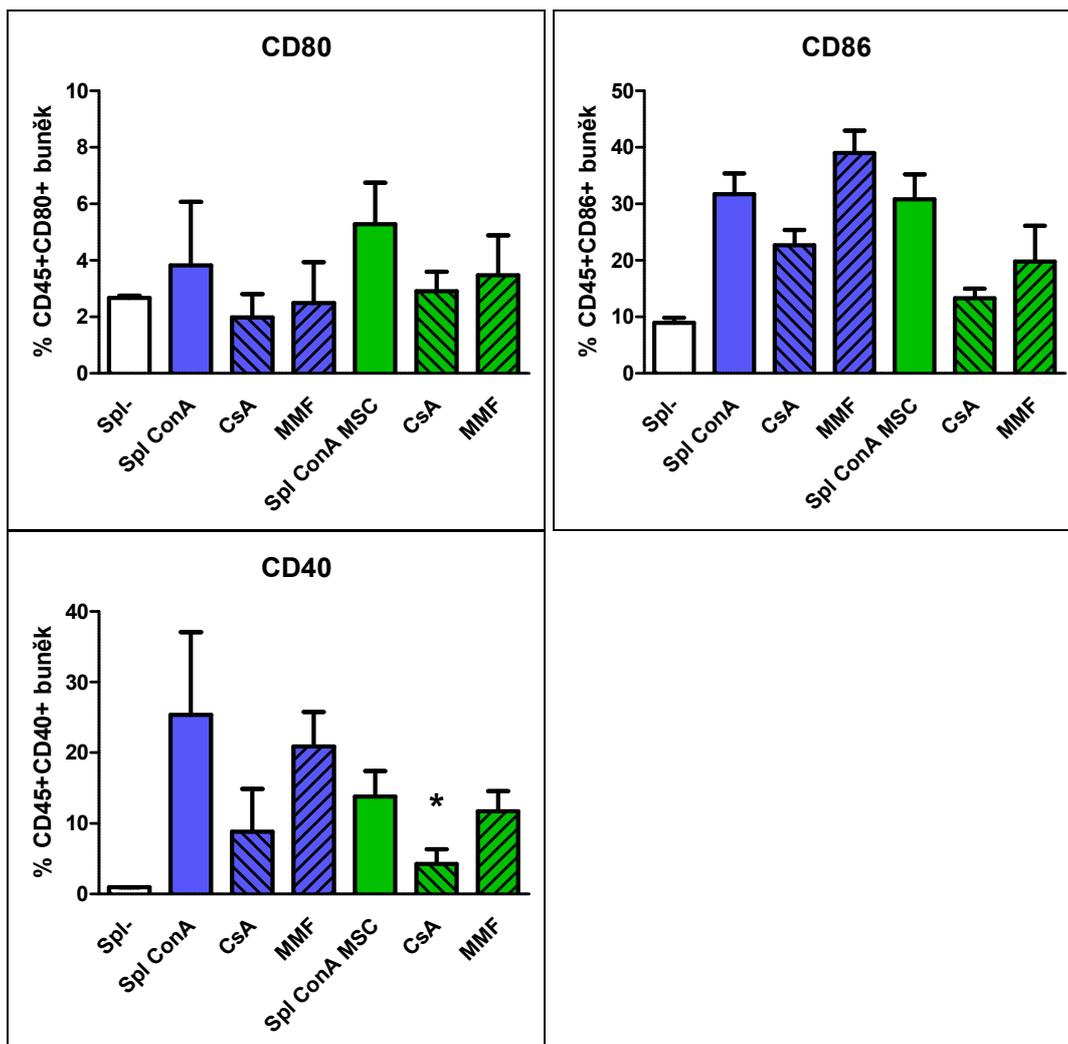
Obrázek 11: **Expresse povrchových znaků MSC v kultuře se splenocyty po působení imunosupresiv 7 dní.** MSC a splenocyty s ConA (MSC Spl ConA) byly ovlivněny po dobu 7 dní CsA (0,05 $\mu\text{g/ml}$) a MMF (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Relativní zastoupení povrchových molekul bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. MSC – nestimulované MSC, MSC Spl – MSC kultivované se splenocyty bez ConA. Data představují průměry a SD ze čtyř nezávislých pokusů.



Obrázek 12: Expres PD-L1 a FasL v kultuře MSC a splenocytů po působení imunosupresiv 7 dní. MSC a splenocyty s ConA (MSC Spl ConA) byly ovlivněny po dobu 7 dní CsA (0,05 $\mu\text{g/ml}$) a MMF (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Relativní zastoupení povrchových molekul bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. MSC – nestimulované MSC, MSC Spl – MSC kultivované se splenocyty bez ConA. Data představují průměry a SD z pěti nezávislých pokusů (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ oproti MSC Spl ConA).

6.6.2. Povrchové znaky splenocytů

Pro určení vlivu MSC na buňky imunitního systému byly detekovány změny povrchových znaků splenocytů kultivovaných spolu s MSC a imunosupresivy. Splenocyty byly stimulovány ConA. Pomocí průtokové cytometrie byly po 48 hodinách detekovány kostimulační molekuly CD80, CD86 a CD40. U splenocytů stimulovaných ConA kultivovaných spolu s MSC a imunosupresivy došlo oproti kontrole ke snížení exprese kostimulačních molekul CD40 a CD86 (Obrázek 13).

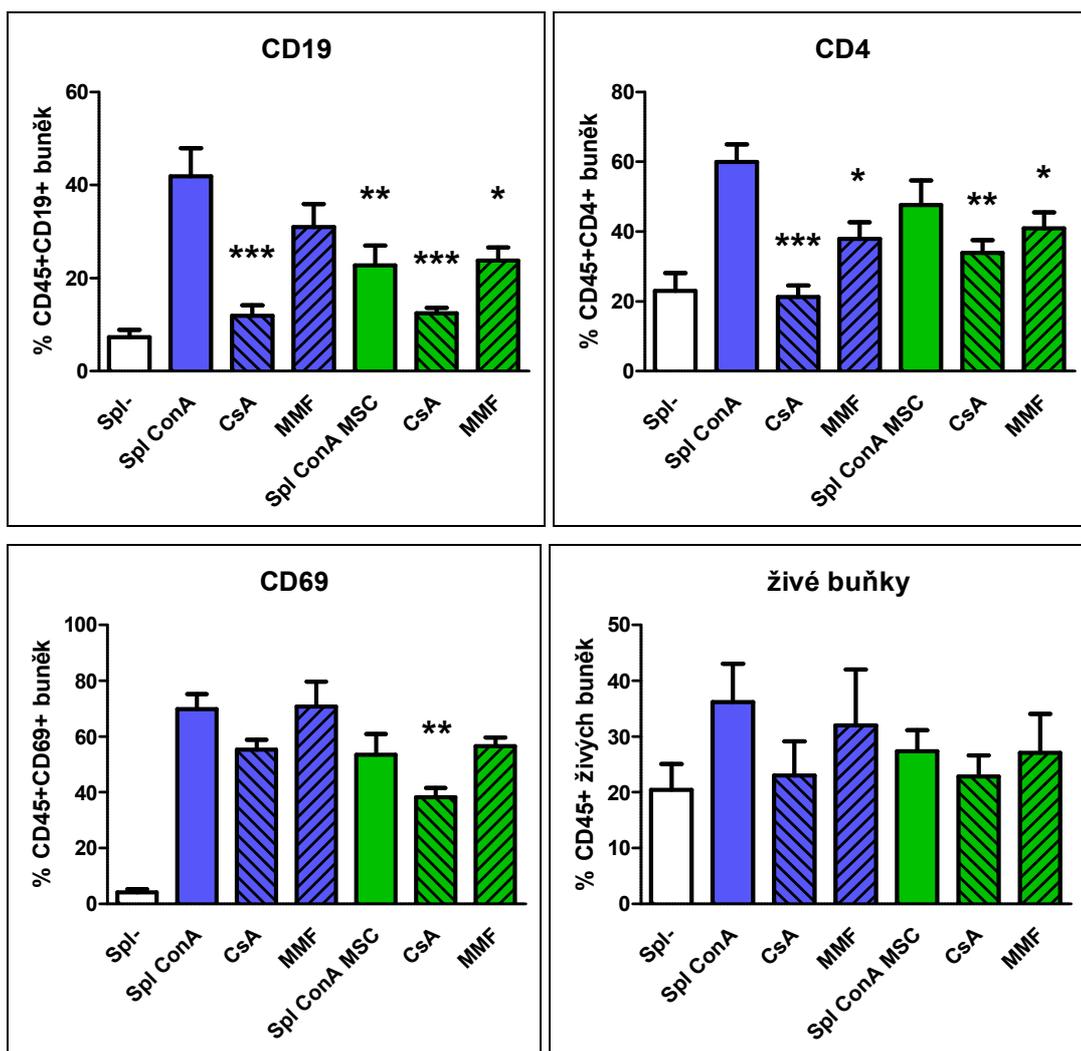


Obrázek 13: **Expresse povrchových molekul splenocytů v kultuře s MSC a imunosupresivy po 48 hodinách.** Expresse kostimulačních molekul byla sledována na stimulovaných splenocytech (Spl ConA.), které byly kultivovány s CsA (0,05 $\mu\text{g/ml}$) a MMF (0,5 $\mu\text{g/ml}$) a MSC (zelená barva) nebo bez MSC (modrá barva). Relativní zastoupení exprese povrchových molekul bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. Data představují průměry a SD ze tří nezávislých pokusů (* $P < 0,05$ oproti Spl ConA).

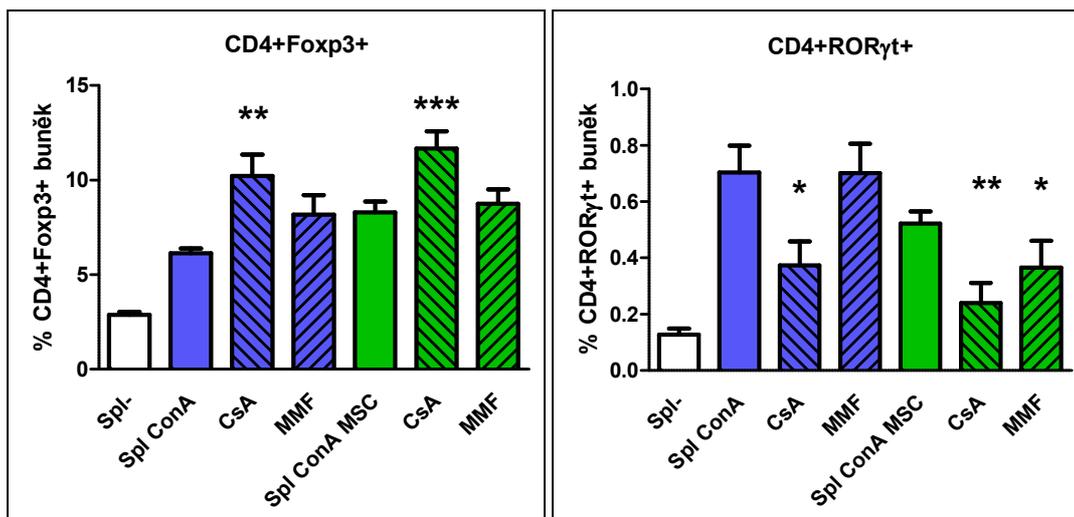
6.6.3. Populace splenocytů

Splenocyty byly kultivovány spolu s MSC a imunosupresivy a následně bylo pomocí průtokové cytometrie měřeno relativní zastoupení jednotlivých populací splenocytů pomocí jejich markerů. Výsledky byly srovnány se splenocyty kultivovanými s imunosupresivy bez MSC. Byly měřeny tyto znaky: CD4 pro T lymfocyty po 96 hodinách, CD69 pro časně aktivované T lymfocyty a CD19 pro B lymfocyty po 48 hodinách, CD206 pro M2 makrofágy, transkripční faktor Foxp3 pro Treg buňky a ROR γ t pro Th17 buňky po 96 hodinách.

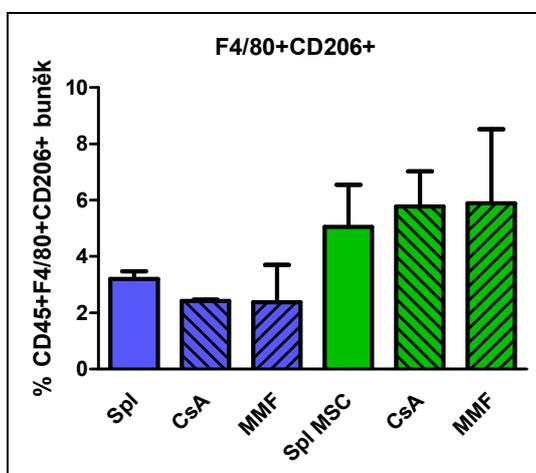
Imunosupresiva snižují počet živých buněk a procentuální zastoupení CD19⁺ a CD4⁺ buněk. Synergistický efekt působení MSC a imunosupresiv byl pozorován u CD69⁺ buněk po ovlivnění MSC a CsA (Obrázek 14). Dále byl sledován poměr Th17 a Treg pomocí detekce jejich transkripčních faktorů ROR γ t a Foxp3 stanovených průtokovou cytometrií. CsA zvyšuje zastoupení populace CD4⁺Foxp3⁺ buněk s mírným nárůstem po ovlivnění MSC a CsA. Naopak procento CD4⁺ROR γ t⁺ buněk při působení MSC klesalo, signifikantní pokles byl zjištěn u splenocytů s CsA a u splenocytů kultivovaných s MSC a imunosupresivy (Obrázek 15). Přítomnost MSC v kultuře má vliv i na makrofágy a mění jejich fenotyp na regulační F4/80⁺CD206⁺ (Obrázek 16).



Obrázek 14: **Relativní zastoupení populací T a B buněk po 48 a 96 hodinách.** Stimulované splenocyty (Spl ConA) byly kultivovány s CsA (0,05 $\mu\text{g/ml}$) nebo MMF (0,5 $\mu\text{g/ml}$) a MSC (zelená barva) nebo bez MSC (modrá barva). Relativní procentuální zastoupení CD19^+ a CD69^+ buněk bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie po 48 hodinách a CD4^+ populace po 96 hodinách na základě detekce povrchových znaků. Data představují průměry a SD ze čtyř nezávislých pokusů (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ oproti Spl ConA).



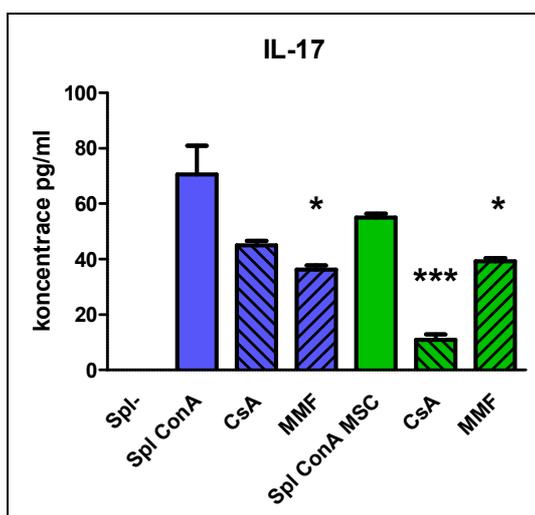
Obrázek 15: **Relativní zastoupení populací Treg a Th17 buněk po 96 hodinách.** Stimulované splenocyty (Spl ConA) byly kultivovány s CsA (0,05 μ g/ml) nebo MMF (0,5 μ g/ml) a MSC (zelená barva) nebo bez MSC (modrá barva). Jednotlivé buněčné populace byly měřeny pomocí průtokové cytometrie na základě detekce transkripčních faktorů Foxp3 a ROR γ t. Data představují průměry a SD ze tří nezávislých pokusů (*P < 0,05; ** P < 0,01 oproti Spl ConA).



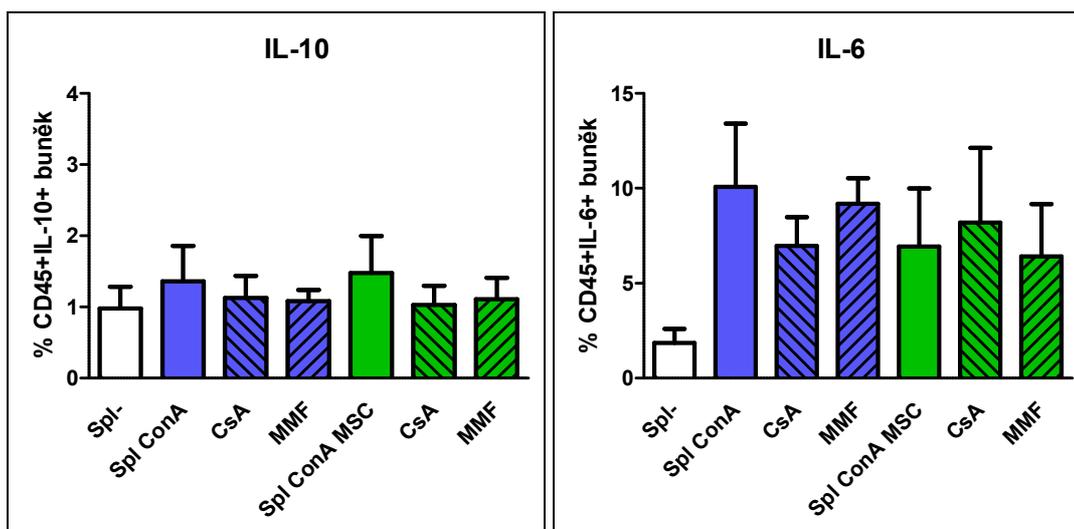
Obrázek 16: **Relativní zastoupení F4/80⁺CD206⁺ makrofágů po 96 hodinách.** Nestimulované splenocyty byly kultivovány s CsA (0,05 μ g/ml) nebo MMF (0,5 μ g/ml) a MSC (zelená barva) nebo bez MSC (modrá barva). Buněčná populace byla měřena pomocí průtokové cytometrie na základě detekce povrchových znaků. Data představují průměry a SD ze tří nezávislých pokusů.

6.6.4. Produkce cytokinů splenocyty

Splenocyty byly kultivovány s imunosupresivy a MSC, byla sledována produkce cytokinů a porovnána s produkcí cytokinů v kultuře bez přítomnosti MSC. Procento $CD45^+IL-10^+$ a $CD45^+IL-6^+$ buněk bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie na základě intracelulárního značení, IL-17 byl měřen ELISA testem. IL-17 produkují hlavně Th17 buňky, u jeho produkce došlo v přítomnosti MSC a imunosupresiv k signifikantnímu poklesu oproti kontrolním stimulovaným splenocytům (Spl ConA), největší snížení bylo u splenocytů s MSC a CsA (Obrázek 17). IL-6 je imunostimulační cytokin, který je produkován například T buňkami, B buňkami nebo makrofágy. V produkci IL-6 nedošlo k významné změně. IL-10 je protizánětlivý cytokin produkováný hlavně regulačními buňkami. Produkce IL-10 se po působení ani jednoho imunosupresiva výrazně nezměnila (Obrázek 18).



Obrázek 17: **Produkce IL-17 splenocyty.** Produkce IL-17 byla měřena pomocí ELISA testu ze supernatantů stimulovaných splenocytů (Spl ConA), které byly kultivovány s CsA (0,05 $\mu\text{g/ml}$) a MMF (0,5 $\mu\text{g/ml}$) a MSC (zelená barva) nebo bez MSC (modrá barva). Data představují průměry a SD ze dvou nezávislých pokusů (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ oproti Spl ConA).



Obrázek 18: **Procentuální zastoupení CD45⁺IL-6⁺ a CD45⁺IL-10⁺ buněk.** Produkce cytokinů byla sledována u stimulovaných splenocytů (Spl ConA), které byly kultivovány s CsA (0,05 µg/ml) a MMF (0,5 µg/ml) a MSC (zelená barva) nebo bez MSC (modrá barva). Relativní procentuální zastoupení jednotlivých populací bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie na základě intracelulárního barvení. Data představují průměry a SD ze tří nezávislých pokusů.

7. Diskuze

V současné době se k potlačení patologických imunitních reakcí jako například v léčbě autoimunitních chorob nebo předcházení odhojení štěpu a GVHD po transplantacích využívají imunosupresivní látky jako CsA, MMF, takrolimus, rapamycin. Imunosupresiva mohou způsobit řadu nežádoucích účinků, mezi nejzávažnější patří poškození ledvin, jater, zažívacího traktu a karcinogenní efekt. Pacienti jsou více náchylní na bakteriální, mykotické, parazitární a virové infekce, často způsobené oportunními patogeny (Halloran 2004). MSC disponují kromě diferenciačních a regenerativních vlastností i schopností imunomodulace (Glennie et al. 2005). Dokážou inhibovat buňky imunitního systému a měnit rovnováhu mezi Th1 a Th2, respektive Th17 a Treg buňkami ve prospěch Th2 a Treg buněk. Podporují přesmyk imunitní odpovědi na protizánětlivou (Aggarwal and Pittenger 2005). Jejich použití v léčbě autoimunitních chorob a při transplantacích by umožnilo snížit koncentrace používaných imunosupresiv a eliminovat závažné nežádoucí účinky. Před uplatněním MSC v klinické léčbě je nutné prostudovat vztah mezi MSC a imunosupresivy. Cílem této práce bylo objasnění interakce mezi MSC a imunosupresivy a jejich vliv na buňky imunitního systému. Byl vybrán CsA a MMF jako zástupci nejčastěji používaných imunosupresiv s rozdílnými mechanismy účinku.

Ověřili jsme, že námi používané MSC izolované z tukové tkáně myši splňují kritéria definující MSC (Dominici et al. 2006). MSC jsme vystavili působení různých koncentrací imunosupresiv vycházejících z klinického použití po dobu 48 hodin a 7 dní. Potvrdili jsme, že v obou časových intervalech má na metabolickou aktivitu MSC zásadní vliv pouze nejvyšší koncentrace MMF. To odpovídá zjištění, že MSC vykazují silnou expresi IMPDH II, která je cílem MMF a její inhibice zabraňuje *de novo* syntéze purinů (Hoogduijn et al. 2008). Na základě těchto pokusů byla vybrána jedna koncentrace pro každé imunosupresivum.

Působení imunosupresiv v našem modelu mění produkci IL-6 a povrchové znaky MSC. Zjistili jsme, že produkce IL-6 byla signifikantně snížena u MSC stimulovaných IFN- γ a kultivovaných společně s MMF. Potřeba IFN- γ pro aktivaci imunomodulačních vlastností MSC byla potvrzena mnoha autory (Crop et al. 2010; Krampera et al. 2006). Naše výsledky jsou v souladu s prací věnující se buňkám endotelu, u kterých byl pozorován pokles hladiny IL-6 po působení MMF, produkce IL-6 byla iniciována TNF- α (Huang et al. 2005).

Krátkodobá kultivace MSC s imunosupresivou nevyvolala změny v expresi povrchových znaků. Po delším působení imunosupresiv jsme pozorovali rozdíly ve fenotypu MSC ovlivněných MMF, zvýšila se exprese CD80, CD86 a naopak snížila exprese CD54, CD106. Inhibice endoteliálních receptorů byla zjištěna po působení MMF jak u endoteliálních buněk (Huang et al. 2005) tak lymfocytů (Blaheta et al. 1998). Kostimulační molekuly za normálních podmínek nejsou na MSC téměř přítomné (Le Blanc et al. 2003), jejich zvýšená exprese po působení MMF může snížit jejich imunoprivilegovanost. Mechanismy a důsledky vyšší exprese je potřeba dále studovat. Také jsme ukázali, že MSC stimulované IFN- γ ovlivněné MMF mají vyšší expresi molekuly PD-L1. Zvýšení exprese PD-L1 po působení IFN- γ odpovídá práci Sheng a kol. (2008), kteří ukázali rozhodující roli této molekuly pro imunosupresivní účinky MSC.

Působení imunosupresiv na MSC nevysvětluje efekty pozorované *in vivo*. Bylo zjištěno, že MSC a MMF mají supresivní synergistický účinek na lymfocyty (Eggenhofer et al. 2011a), na druhé straně po působení MSC a CsA byly kromě synergistických zjištěny i antagonistické účinky, které způsobily rychlejší odhojení štěpu (Inoue et al. 2006; Zhang et al. 2007). V organismu MSC interagují s buňkami imunitního systému, proto jsme sledovali změny exprese povrchových znaků MSC v kultuře se splenocyty. V případě kostimulačních a adhezivních molekul jsme potvrdili stejnou tendenci jako u stimulace samotných MSC. Signifikantní zvýšení jsme zjistili u exprese PD-L1 na MSC kultivovaných se splenocyty a MMF a naopak signifikantní snížení v přítomnosti CsA. To je pravděpodobně dáno rozdílnými mechanismy účinku u CsA a MMF. PD-L1 patří mezi molekuly zprostředkovávající mezibuněčný kontakt MSC a jiných buněk. Bylo zjištěno, že PD-L1 hraje důležitou roli v indukci Treg buněk a způsobuje zvýšení exprese transkripčního faktoru Foxp3 (Mokarizadeh et al. 2012). V nepřítomnosti molekuly PD-L1 na buňkách prezentujících antigen nedochází k přesmyku naivních CD4⁺ buněk na Treg buňky (Francisco et al. 2009). Jiné výsledky ukázali, že molekula PD-L1 na MSC má vliv na snížení počtu Th17 buněk. Zabraňuje jejich vzniku, ale produkci IL-17 zralými Th17 neovlivní (Luz-Crawford et al. 2012).

Další molekulou účastnící se kontaktu mezi buňkami je FasL, který po navázání na svůj receptor spouští apoptickou smrt. Zjistili jsme, že exprese FasL na MSC kultivovaných spolu se splenocyty byla signifikantně zvýšena po působení obou imunosupresiv. FasL na MSC po navázání na Fas receptor T lymfocytů indukuje

apoptickou smrt, přítomnost apoptických buněk aktivuje makrofágy, které začnou produkovat zvýšené množství TGF- β . TGF- β je determinujícím faktorem pro vznik Treg buněk (Akiyama et al. 2012). Alternativně aktivované makrofágy M2 produkují kromě IL-10 i TGF- β . Po kultivaci splenocytů a MSC s imunosupresivou jsme ověřili přítomnost M2 makrofágů pomocí jejich markeru CD206. V kultuře s MSC a imunosupresivou je zastoupení F4/80⁺CD206⁺ buněk vyšší než v kultuře bez MSC. Naše výsledky odpovídají zjištění, že makrofágy po působení MSC mění svůj fenotyp na M2, produkují více IL-10, IL-6 a méně IL-12, TNF- α (Kim and Hematti 2009).

Výsledky ukazující procentuální zastoupení PD-L1⁺ a FasL⁺ buněk z průtokové cytometrie jsme potvrdili měřením z real-time PCR na MSC stimulovaných IFN- γ . Sledovali jsme také expresi molekuly Cox-2, která se signifikantně zvýšila u MSC kultivovaných s MMF. Cox-2 je enzym zajišťující přeměnu mastných kyselin na PGE2, který má řadu imunomodulačních účinků. Mimo jiné PGE2 indukuje vznik Foxp3⁺ Treg buněk (English et al. 2009) a inhibuje vývoj Th17 buněk a jejich produkci prozánětlivých cytokinů (Ghannam et al. 2010).

Jednou z důležitých vlastností MSC je jejich imunomodulační vliv na buňky imunitního systému, proto jsme sledovali vliv MSC na splenocyty při jejich společné kultivaci s imunosupresivou. U molekul CD40 a CD86 došlo k většímu poklesu jejich exprese, pokud v kultuře byly přítomné MSC. Snížení kostimulačních molekul na povrchu buněk prezentujících antigen neumožní aktivaci T lymfocytů a dojde ke zvýšení imunosupresivního účinku. MSC a imunosupresiva mají také vliv na zastoupení jednotlivých populací splenocytů. Po jejich působení došlo k poklesu zastoupení CD19⁺ a CD69⁺ buněk. CsA inhibuje produkci IL-2 a tím aktivaci T buněk (Matsuda and Koyasu 2000), MMF naopak zabraňuje jejich proliferaci a na časnou aktivaci T buněk vliv nemá (Allison and Eugui 2000), proto byl větší pokles CD69⁺ buněk pozorován u CsA. Na B lymfocyty MMF a CsA působí, jak přímo tak přes inhibici T lymfocytů.

MSC mohou měnit poměr mezi Th17 a Treg buňkami, zabraňují vývoji Th17 buněk a naopak podporují vznik Treg buněk (Svobodova et al. 2012). Zjistili jsme, že v přítomnosti MSC a imunosupresiv procento CD4⁺Foxp3⁺ buněk má tendenci k nárůstu, k největšímu zvýšení došlo u splenocytů kultivovaných s MSC a CsA. To je v souladu se zvýšenou expresí FasL u MSC kultivovaných spolu se splenocyty a CsA. Někteří autoři uvádí, že vyšší exprese FasL na MSC způsobí nárůst apoptózy. Apoptické buňky následně aktivují alternativní makrofágy a jejich produkci TGF- β .

Zvýšená hladina TGF- β spouští přesmyk CD4⁺ naivních T lymfocytů na Treg buňky (Akiyama et al. 2012). Na druhé straně jsme dokázali, že MSC i imunosupresiva snižují zastoupení CD4⁺ROR γ t⁺ buněk, k výraznějšímu poklesu došlo, pokud byly v kultuře jak MSC, tak imunosupresiva. Snížení Th17 buněk po kultivaci splenocytů s MSC a MMF má souvislost se zvýšenou expresí molekuly PD-L1. MSC kontaktem přes PD-L1 brání naivním CD4⁺ lymfocytům ve vývoji na Th17 buňky (Luz-Crawford et al. 2012).

Th17 buňky produkují kromě jiných prozánětlivých cytokinů IL-17. Potvrdili jsme, že vzhledem ke kontrole dochází k poklesu produkce u všech vzorků. Největší snížení bylo zaznamenáno v kultuře splenocytů a MSC s CsA, u MMF zůstalo množství IL-17 nezměněné. MSC inhibují vývoj Th17 buněk, ale u zralých Th17 produkci IL-17 neovlivní (Luz-Crawford et al. 2012). Jiné výsledky ukazují, že MSC u Th17 blokuje produkci jejich prozánětlivých cytokinů (Ghannam et al. 2010).

Na vznik Treg a inhibici Th17 buněk má vliv i vyšší koncentrace IL-10, po působení MSC dochází k indukci regulačních buněk a k vyšší produkci IL-10. Naše výsledky toto nepotvrdily, v kultuře s MSC ke zvýšení počtu CD45⁺IL-10⁺ buněk nedošlo. Zastoupení této populace bylo malé, pro potvrzení výsledků bude potřeba opakovat měření v jiných časech. Procento CD45⁺IL-6⁺ buněk se v kultuře splenocytů, MSC a imunosupresiv oproti kontrole snížilo u buněk kultivovaných pouze s imunosupresivy, stejně jako u buněk kultivovaných s imunosupresivy a MSC. IL-6 je spolu s TGF- β hlavním determinačním faktorem Th17 buněk, jeho potlačení tedy vede ke snížení vývoje Th17 buněk (Zhou et al. 2008b).

Na základě těchto výsledků usuzujeme, že na pokles CD4⁺ROR γ t⁺ buněk v kultuře s MSC a MMF má vliv zvýšená exprese PD-L1 a Cox-2. Na druhé straně nárůst populace CD4⁺Foxp3⁺ buněk po působení MSC a CsA je způsoben zvýšením exprese FasL a pravděpodobně nárůstem počtu apoptických buněk. Podání imunosupresiv dohromady s MSC mění vlastnosti různých buněk imunitního systému a posouvá imunitní odpověď směrem k protizánětlivé. Dochází k potlačení vývoje Th17 buněk, zvýšení množství Treg buněk a alternativně aktivovaných makrofágů. Námi zjištěné výsledky ukazují vhodnost použití MSC v kombinaci s MMF i CsA v potlačení nežádoucích imunitních reakcí. Aplikace MSC v terapii by umožnila snížení koncentrace imunosupresiv a eliminovala jejich závažné vedlejší účinky. Pro celkové objasnění musí být provedeny další studie a převedení systému do *in vivo* modelu.

8. Závěr

- Na metabolickou aktivitu MSC má vliv pouze nejvyšší testovaná koncentrace MMF.
- Působení imunosupresiv na MSC způsobuje změny v povrchových i solubilních molekulách. Snížení produkce IL-6 bylo pozorováno u MSC stimulovaných IFN- γ a kultivovaných s MMF.
- Krátkodobá kultivace MSC s imunosupresivy nevyvolala změny v povrchových markerech. Po delší kultivaci došlo ke zvýšení exprese kostimulačních molekul a snížení exprese adhezivních molekul. To bylo potvrzeno i v kultuře MSC se splenocyty.
- Společná kultivace MSC, splenocytů a imunosupresiv způsobila změny jak u MSC tak splenocytů. U splenocytů došlo ke snížení CD86⁺ a CD40⁺ buněk. MSC v kombinaci s CsA měly synergistický vliv na snížení množství CD69⁺ buněk.
- MSC v kombinaci s imunosupresivy ovlivňují i makrofágy, zvyšují počet alternativně aktivovaných CD206⁺ buněk.
- Zvýšená exprese povrchových molekul MSC podporuje diferenciaci naivních CD4⁺ buněk na Treg buňky a naopak brání vývoji Th17 buněk. V kultuře splenocytů byl pozorován synergistický efekt MSC a MMF na snížení populace CD4⁺ROR γ t⁺ buněk v důsledku zvýšené exprese PD-L1 a Cox-2 u MSC. Naopak nárůst populace CD4⁺Foxp3⁺ buněk po působení MSC a CsA byl pravděpodobně způsoben zvýšením exprese FasL u MSC.
- Naše výsledky ukazují vhodnost terapeutického použití MSC v kombinaci s oběma imunosupresivy, protože dochází k inhibici buněk způsobujících nežádoucí zánětlivé reakce a naopak aktivaci buněk regulačního fenotypu. Působení MSC spolu s imunosupresivy umožňuje přesmyk imunitní odpovědi na protizánětlivou.

9. Přehled literatury

- Aggarwal, S., Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
- 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.
- Allison, A.C., 2000. Immunosuppressive drugs, the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 47, 63-83.
- Allison, A.C., Eugui, E.M., 2000. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85-118.
- 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.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H., Ochiya, T., 2007. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 46, 219-228.
- 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.
- Blaheta, R.A., Leckel, K., Wittig, B., Zenker, D., Oppermann, E., Harder, S., Scholz, M., Weber, S., Schuldes, H., Encke, A., Markus, B.H., 1998. Inhibition of endothelial receptor expression and of T-cell ligand activity by mycophenolate mofetil. *Transplant Immunology* 6, 251-259.
- Buron, F., Perrin, H., Malcus, C., Hequet, O., Thaunat, 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.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A.G., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., Fisk, N.M., 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem-cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9, 641-650.
- Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Souillou, J.P., Anegon, I., Cuturi, M.C., 2007. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 110, 3691-3694.
- Cho, H.H., Bae, Y.C., Jung, J.S., 2006. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells* 24, 2744-2752.
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D.J., Patani, R., Michell, A.W., Du, M.Q., Luan, S.L., Altmann, D.R., Thompson, A.J., Compston, A., Scott, M.A., Miller, D.H., Chandran, S., 2012. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurology* 11, 150-156.
- 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.

- Crop, M.J., Baan, C.C., Korevaar, S.S., Ijzermans, J.N.M., Pescatori, M., Stubbs, A.P., van Ijcken, W.F.J., Dahlke, M.H., Eggenhofer, E., Weimar, W., Hoogduijn, M.J., 2010. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology* 162, 474-486.
- Deans, R.J., Moseley, A.B., 2000. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* 28, 875-884.
- 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.
- Djouad, F., Charbonnier, L.M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., Noel, D., 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 25, 2025-2032.
- 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.
- Duijvestein, M., Vos, A.C.W., Roelofs, H., Wildenberg, M.E., Wendrich, B.B., Verspaget, H.W., Kooy-Winkelaar, E.M.C., Koning, F., Zwaginga, J.J., Fidder, H.H., Verhaar, A.P., Fibbe, W.E., van den Brink, G.R., Hommes, D.W., 2010. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 59, 1662-1669.
- Eggenhofer, E., Renner, P., Soeder, Y., Popp, F.C., Hoogduijn, M.J., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., Dahlke, M.H., 2011a. Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transplant Immunology* 25, 141-147.
- Eggenhofer, E., Steinmann, J.F., Renner, P., Slowik, P., Piso, P., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., Dahlke, M.H., Popp, F.C., 2011b. Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. *Transplant Immunology* 24, 157-163.
- 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.
- Erices, A., Conget, P., Minguell, J.J., 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* 109, 235-242.
- Francisco, L.M., Salinas, V.H., Brown, K.E., Vanguri, V.K., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., Sharpe, A.H., 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 206, 3015-3029.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S., 1970. Development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation* 3, 393-403.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D.M., Mao, M.W., Chen, D., Zhang, H.J., Ding, Y.Z., Bromberg, J.S., 2004. TGF-beta induces Foxp3⁺T-regulatory cells from CD4⁺CD25⁺-precursors. *American Journal of Transplantation* 4, 1614-1627.

- 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.
- 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.
- Glomsda, B.A., Blaheta, R.A., Hailer, N.P., 2003. Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *Spinal Cord* 41, 610-619.
- Grinnemo, K.H., Mansson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringden, O., Sylven, C., Le Blanc, K., 2004. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 127, 1293-1300.
- Groh, M.E., Maitra, B., Szekely, E., Koc, O.N., 2005. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Experimental Hematology* 33, 928-934.
- Gronthos, S., Zannettino, A.C.W., Hay, S.J., Shi, S.T., Graves, S.E., Kortessidis, A., Simmons, P.J., 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science* 116, 1827-1835.
- Halloran, P.F., 2004. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *New England Journal of Medicine* 351, 2715-2729.
- Hoogduijn, M.J., Crop, M.J., Korevaar, S.S., Peeters, A.M.A., Eijken, M., Maat, L., Balk, A., Weimar, W., Baan, C.C., 2008. Susceptibility of Human Mesenchymal Stem Cells to Tacrolimus, Mycophenolic Acid, and Rapamycin. *Transplantation* 86, 1283-1291.
- Houde, V.P., Brule, S., Festuccia, W.T., Blanchard, P.G., Bellmann, K., Deshaies, Y., Marette, A., 2010. Chronic Rapamycin Treatment Causes Glucose Intolerance and Hyperlipidemia by Upregulating Hepatic Gluconeogenesis and Impairing Lipid Deposition in Adipose Tissue. *Diabetes* 59, 1338-1348.
- Huang, Y.F., Liu, Z.H., Huang, H.D., Liu, H., Li, L.S., 2005. Effects of mycophenolic acid on endothelial cells. *International Immunopharmacology* 5, 1029-1039.
- in't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W.A., Claas, F.H.J., Willemze, R., Fibbe, W.E., Kanhai, H.H.H., 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548-1549.
- in't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G., Claas, F.H.J., Fibbe, W.E., Kanhai, H.H.H., 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22, 1338-1345.
- Inoue, S., Popp, F.C., Koehl, G.E., Piso, P., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., Dahlke, M.H., 2006. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 81, 1589-1595.
- Kim, J., Hematti, P., 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* 37, 1445-1453.
- 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-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 386-398.
- Kunnathodi, F., Shahbazov, R., Borenstein, N., Kanak, M., Takita, M., Levy, M., Naziruddin, B., Lawrence, M., 2013. Human Pancreas-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Function of Transplanted Islets and Native Pancreas to Reverse Diabetes. *Transplantation* 96, S104-S104.
- Lazarus, H.M., Koc, O.N., Devine, S.M., Curtin, P., Maziarz, R.T., Holland, H.K., Shpall, E.J., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B.W., Gerson, S.L., Laughlin, M.J., Loberiza, F.R., Moseley, A.B., Bacigalupo, A., 2005. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 11, 389-398.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., Ringden, O., 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 33, S185-S185.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O., 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 31, 890-896.
- Lee, J.S., Hong, J.M., Moon, G.J., Lee, P.H., Ahn, Y.H., Bang, O.Y., Collaborators, S., 2010. A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. *Stem Cells* 28, 1099-1106.
- Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., Bae, Y.C., Jung, J.S., 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry* 14, 311-324.
- Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarlasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M.L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F., 2008. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing notch signaling. *Stem Cells* 26, 279-289.
- Liu, Y.B., Dulchavsky, D.S., Gao, X.H., Kwon, D., Chopp, M., Dulchavsky, S., Gautam, S.C., 2006. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *Journal of Surgical Research* 136, 336-341.
- Luz-Crawford, P., Noel, D., Fernandez, X., Khoury, M., Figueroa, F., Carrion, F., Jorgensen, C., Djouad, F., 2012. Mesenchymal Stem Cells Repress Th17 Molecular Program through the PD-1 Pathway. *Plos One* 7, 11.
- Maccario, R., Moretta, A., Cometa, A., Montagna, D., Comoli, P., Locatelli, F., Podesta, M., Frassoni, F., 2005. Human mesenchymal stem cells and cyclosporin A exert a synergistic suppressive effect on in vitro activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 11, 1031-1032.
- Mancheno-Corvo, P., Franquesa, M., DelaRosa, O., Ramirez, C., Garcia-Benzaquen, L., Fernandez, V., Menta, R., del Rio, B., Beraza, A., Dalemans, W., Hoogduijn, M., Lombardo, E., 2013. Adipose mesenchymal stromal cell function is not affected by treatment with methotrexate and azathioprine. *Human Gene Therapy* 24, A148-A148.

- Matsuda, S., Koyasu, S., 2000. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47, 119-125.
- Matsumoto, R., Omura, T., Yoshiyama, M., Hayashi, T., Inamoto, S., Koh, K.R., Ohta, K., Izumi, Y., Nakamura, Y., Akioka, K., Kitaura, Y., Takeuchi, K., Yoshikawa, J., 2005. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 25, 1168-1173.
- Mazzini, L., Ferrero, I., Luparello, V., Rustichelli, D., Gunetti, M., Mareschi, K., Testa, L., Stecco, A., Tarletti, R., Miglioretti, M., Fava, E., Nasuelli, N., Cisari, C., Massara, M., Vercelli, R., Oggioni, G.D., Carriero, A., Cantello, R., Monaco, F., Fagioli, F., 2010. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Experimental Neurology* 223, 229-237.
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., Dilloo, D., 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619-4621.
- Mokarizadeh, A., Delirez, N., Morshedi, A., Mosayebi, G., Farshid, A.A., Mardani, K., 2012. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunology Letters* 147, 47-54.
- 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.
- Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., Francois, S., Mazurier, C., Boutarfa, A., Bouchet, S., Gorin, N.C., Thierry, D., Fouillard, L., 2007. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: Involvement of HLA-G. *Transplantation* 84, 231-237.
- Nauta, A.J., Westerhuis, G., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E.G.A., Willemze, R., Fibbe, W.E., 2006. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108, 2114-2120.
- Neuss, S., Becher, E., Woltje, M., Tietze, L., Jahnen-Dechent, W., 2004. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 22, 405-414.
- Peng, Y.W., Ke, M., Xu, L., Liu, L.S., Chen, X.Y., Xia, W.J., Li, X.B., Chen, Z., Ma, J.J., Liao, D.H., Li, G.H., Fang, J.L., Pan, G.H., 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.
- 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.
- Phinney, D.G., Prockop, D.J., 2007. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair - Current views. *Stem Cells* 25, 2896-2902.
- Pischiutta, F., D'Amico, G., Dander, E., Biondi, A., Biagi, E., Citerio, G., De Simoni, M.G., Zanier, E.R., 2014. Immunosuppression does not affect human bone

- marrow mesenchymal stromal cell efficacy after transplantation in traumatized mice brain. *Neuropharmacology* 79, 119-126.
- Plock, J. A., Schnider, J. T., Solari, M. G., Zheng, X. X., Gorantla, V. S., 2013. Perspectives on the use of mesenchymal stem cells in vascularized composite allotransplantation. *Frontiers in immunology* 4, 175-182.
- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., Domenech, J., 2007. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737-1745.
- 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.
- Prasad, V.K., Lucas, K.G., Kleiner, G.I., Talano, J.A.M., Jacobsohn, D., Broadwater, G., Monroy, R., Kurtzberg, J., 2011. Efficacy and Safety of Ex Vivo Cultured Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal (TM)) in Pediatric Patients with Severe Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease in a Compassionate Use Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17, 534-541.
- Qu, X.B., Liu, X.X., Cheng, K., Yang, R.C., Zhao, R.C.H., 2012. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Experimental Hematology* 40, 761-770.
- 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.
- Ruster, B., Bistran, R., Gottig, S., Seifried, E., Henschler, R., 2004. Mesenchymal stem cells (MSC) display coordinated rolling and adhesion behaviour on endothelial cells under shear flow. *Blood* 104, 193A-193A.
- 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.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K., 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228-234.
- 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.
- Sheng, H.M., Wang, Y., Jin, Y.Q., Zhang, Q.Y., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., Li, N.L., 2008. A critical role of IFN gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research* 18, 846-857.
- Shi, D., Liao, L.M., Zhang, B., Liu, R., Dou, X.W., Li, J., Zhu, X.S., Yu, L.M., Chen, D.X., Zhao, R.C.H., 2011. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1-mediated inhibition of NF-kappa B signaling. *Experimental Hematology* 39, 214-224.

- Shih, D.T.B., Lee, D.C., Chen, S.C., Tsai, R.Y., Huang, C.T., Tsai, C.C., Shen, E.Y., Chiu, W.T., 2005. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 23, 1012-1020.
- Singha, U.K., Jiang, Y., Yu, S.B., Luo, M., Lu, Y., Zhang, J., Xiao, G.Z., 2008. Rapamycin inhibits osteoblast proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells and primary mouse bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 103, 434-446.
- Sordi, V., Malosio, M.L., Marchesi, F., Mercuri, A., Melzi, R., Giordano, T., Belmonte, N., Ferrari, G., Leone, B.E., Bertuzzi, F., Zerbini, G., Allavena, P., Bonifacio, E., Piemonti, L., 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 106, 419-427.
- Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Moretta, L., 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E₂. *Blood* 113, 6576-6583.
- 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.
- 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.
- Stepkowski, S. M., 2000. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert reviews in molecular medicine* 2, 1-23.
- 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.
- Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., Kessler, P.D., 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98.
- Tomchuck, S.L., Zvezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danka, E.S., Scandurro, A.B., 2008. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 26, 99-107.
- Tomita, M., Reinhold, M.I., Molkentin, J.D., Naski, M.C., 2002. Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42214-42218.
- Tropel, P., Platet, N., Platel, J.C., Noel, D., Albrieux, M., Benabid, A.L., Berger, F., 2006. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 2868-2876.
- Von Luttichau, I., Notohamiprodjo, M., Wechselberger, A., Peters, C., Henger, A., Seliger, C., Djafarzadeh, R., Huss, R., Nelson, P.J., 2005. Human adult CD34(-) progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells and Development* 14, 329-336.
- 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.

- Winslow, M.M., Pan, M.G., Starbuck, M., Gallo, E.M., Deng, L., Karsenty, G., Crabtree, G.R., 2006. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Developmental Cell* 10, 771-782.
- Wynn, R.F., Hart, C.A., Corradi-Perini, C., O'Neill, L., Evans, C.A., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., Bellantuono, I., 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 104, 2643-2645.
- Zhang, W., Qin, C., Zhou, Z.M., 2007. Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model. *Transplantation Proceedings* 39, 3404-3408.
- 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, II, Min, R., Victora, G.D., Shen, Y.L., Du, J.G., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., Ziegler, S.F., Littman, D.R., 2008b. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T_H17 cell differentiation by antagonizing ROR gamma t function. *Nature* 453, 236-240.