A hisztamin szabályozó szerepének vizsgálata a vérképzésben

Doktori értekezés

Dr. Horváth Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Buzás Edit egyetemi docens, Ph.D., MTA Doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Szeberényi Júlia egyetemi tanársegéd, Ph.D.
Dr. Bodó Imre főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Fekete Béla egyetemi tanár, Ph.D., MTA Doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dérfalvi Beáta egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Lustyik György egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2010

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 3

I. BEVEZETÉS 5
I.1. A VÉRKÉPZÉS 5
I.1.1. A vérképzés helye, a vérképző sejtek, sejtvonalak 5
I.1.2. A hematopoietikus őssejt 7
I.1.3. A vérképzés szabályozása 12
I.1.4. A besugárzás hatása a vérképzésre 18
I.2 A HISZTAMIN 26
I.2.1. A hisztamin általános tulajdonságai, alapvető funkciói 26
I.2.2. A hisztaminreceptorok 28
I.3. A HISZTAMIN SZEREPE A CSONTVELŐBEN 31
I.3.1. A hisztamin hatása az őssejtekre 31
I.3.2. A hisztamin és a hematopoietikus citokinek 34
I.3.3. A hisztamin és a besugárzás 36
I.4. KÉRDÉSFELTEVÉS 37

II. CÉLKITŰZÉSEK 39

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 40
III.1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK 40
III.2. BESUGÁRZÁS-INDUKÁLT CSONTVELŐ-REGENERÁCIÓS MODELL – IN VIVO 40
III.2.1. Csontvelői, léperedetű és perifériás vérsejtek izolálása 41
III.3. IN VITRO RENDSZEREK 42
III.3.1. IL-3 stimulált csontvelői és léptenyészetek 42
III.3.2. Az IL-3 receptor sejtfelszíni expressziójának *in vitro* vizsgálata 43
III.4. ÁRAMLÁSI (FLOW) CITOMETRIÁS VIZSGÁLATOK 44
III.4.1. Csontvelői érési alakok jellemzése 45
III.4.2. Sejtfelszíni IL-3 receptor expresszió mérése 47
III.4.3. A H1R és H2R felszíni expressziójának vizsgálata 47
III.4.4. Intracelluláris hisztamin- és HDC-tartalom mérése 48
III.4.5. Sejtciklus-analízis 49
III.4.6. Az IL-3 jelátvitel vizsgálata 49
III.5. ELISA-MÉRÉSEK 50
III.6. COLONY-FORMING UNIT (CFU) ASSAY 51
III.7. RNS IZOLÁLÁS, REVERZ TRANSZKRIPCIÓ ÉS REAL-TIME PCR 52
III.8. AZ APOPTÓZIS VIZSGÁLATA 54
III.8.1 A kísérleti rendszereink apoptózis vizsgálatához 54
III.8.2. Az apoptózis flow citometriás vizsgálata 55
III.9. STATISZTIKAI ELEMZÉSEK 56

IV. EREDMÉNYEK 57
IV.1. $HDC^{+/+}$ ÉS $HDC^{-/-}$ EGEREK NYUGALMI ÉS STRESSZ-INDUKÁLT CSONTVELŐI VÉRKÉPZÉSÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA 57

IV.2. Őssejt-populációk HDC és hisztamintartalmának meghatározása a csontvelő-regeneráció során. A hisztamin-receptorok szerepe a vérképzésben 66
IV.3. Az IL-3 jelátvitel összehasonlítása $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerekben 71
IV.4. Az extramedulláris vérképzés vizsgálata $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerekben 78
IV.5. $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek vérképző sejtjeinek apoptózis-vizsgálata 85

V. MEGBESZÉLÉS 90

VI. KÖVETKEZTETÉS 111

ÖSSZEFOGLALÓ 115

SUMMARY 116

IRODALOMJEGYZÉK 117

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 137

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 138

A dolgozatban gyakran használt rövidítések jegyzéke

ANOVA	varianciaanalízis, *Analysis of Variance*
APC	*allophycocyanin*
BFU-E	*burst-forming unit-erythroid*
BSA	marha szérum albumin, *bovine serum albumin*
Balb/c	beltenyésztett egértörzs
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
CD	sejtfelszíni marker azonosító, *Cluster of Differentiation*
CDK	ciklin dependens kináz
cDNS	komplementer DNS
CFA	komplett Freund adjuváns, *Complete Freund's Adjuvant*
CFU	kolóniaformáló egység, *colony-forming unit*
CFU-F	fibroblaszt-CFU
CFU-GEMM	granulocita-eritroid-megakariocita-makrofág-CFU
CFU-GM	granulocita-makrofág-CFU
CFU-Meg	megakariocita-CFU
CFU-S	lép-CFU, *CFU-spleen*
CSF	*colony-stimulating factor*, kolóniastimuláló faktor
DAO	diamin-oxidáz
DMSO	dimetil-szulfoxid
ECP	eozinofil kemotaktikus potein
EDAC	etil-dimetilaminopropil-karbodiimid
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPO	eritropoietin
ERK	*extracellular signal-regulated kinase*
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorting*
FCS	embrionális borjúsavó, *Fetal Calf Serum*
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FLT3L	*fms-like tyrosine kinase receptor-3 ligand*
FMH	fluorometil-hisztidin
FVS	fehérvérsejt
G-CSF	granulocita-kolóniastimuláló faktor
GEO	*Gene Expression Omnibus Profile*
Gy	Gray
GM-CSF	granulocita-makrofág-kolóniastimuláló faktor
H1R	hisztamin H1 receptor
H2R	hisztamin H2 receptor
H3R	hisztamin H3 receptor
H4R	hisztamin H4 receptor
HDC	L-hisztidin-dekarboxiláz
HDC$^{+/+}$	L-hisztidin-dekarboxilázra vad genotípusú
HDC$^{-/-}$	L-hisztidin-dekarboxiláz génkiütött
HGPRT	hipoxanthin-guanin foszforibozil transzferáz
HNMT	hisztamin-N-metil transzferáz
HSC	hematopoietikus őssejt
ICAM	*intercellular adhesion molecule*
IFN	interferon
IL	interleukin
IL3Ra	IL-3 receptor alfa lánc
IL3Rb	IL-3 receptor béta lánc

IMDM	Iscove-féle módosított Dulbecco médium
JAK	janus arcú kináz
kDa	kilodalton
LIF	leukémia inhibitoros faktor
Lin	Lineage
LPS	lipopoliszacharid
LTR	hosszútávú repopulációra képes sejt, *long-term repopulating cell*
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
mRNS	messenger RNS
MTT	dimetiltiazol-difenil-tetrazólium bromid
NK	natural killer sejt
OD	optikai denzitás
PBS	foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldat, *phosphate-buffered saline*
PCR	polimeráz láncreakció, *polymerase chain reaction*
PE	*phycoerythrin*
PerCP	peridinin-klorofill-protein komplex
PI	propidium-jodid
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
P-STAT5	foszfo-STAT5
RFI	relatív fluoreszcencia intenzitás
rIL-3	rekombináns IL-3
RNS	ribonukleinsav
Sca	*stem cell antigen*
SCF	őssejtfaktor, Ckit-ligand, *stem cell factor*
SEM	standard hiba, *Standard Error of Mean*
Shc	Src-homológ-2-domént tartalmazó adapter molekula
SOCS	*suppressors of cytokine signalling*
STAT	*signal transducer and activator of transcription*
STR	rövidtávú repopulációra képes sejt, *short-term repopulating cell*
Tc	citotoxikus T-sejt
TGF	*transforming growth factor*
Th	helper T-sejt
TNF	tumor nekrózis faktor
TPO	trombopoietin
Treg	regulátoros T-sejt
VCAM	*vascular cell adhesion molecule*
VVS	vörösvérsejt

I. Bevezetés

Jelen doktori értekezés tárgyát egy kismolekulájú biogén aminnak, a hisztaminnak, a vérképző ős- és progenitorsejtek működését, osztódását és differenciálódását befolyásoló hatásainak elemzése képezi.

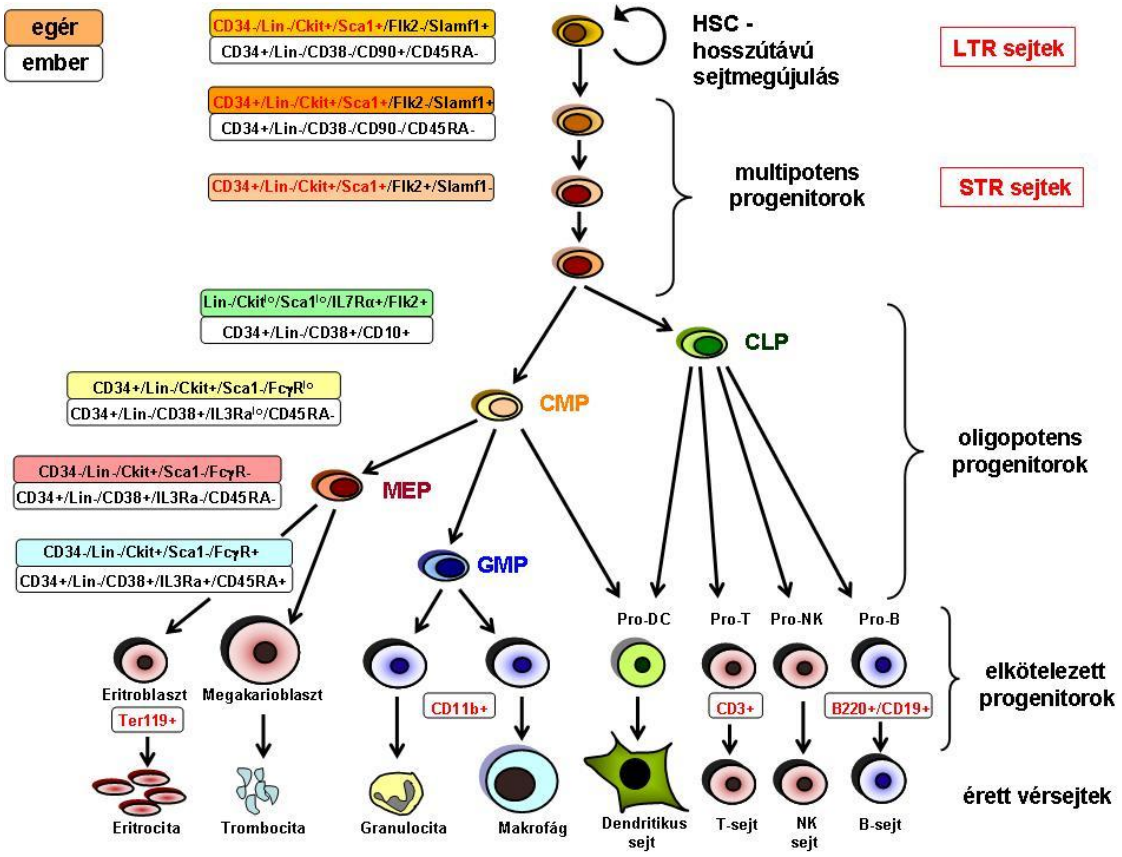
I.1. A VÉRKÉPZÉS

A vérképzés élettani folyamat, amely a vér alakos elemeinek folyamatos utánpótlását szolgálja. Rendkívül összetett rendszer, melyet pluripotens, éretlen elkötelezett, és érett hematopoietikus sejtek, a vérképzés fészkét alkotó strómasejtek, és e rendszer elemei között összeköttetést nyújtó moduláló faktorok alkotnak. Ezek szigorúan szabályozott együttműködése biztosítja a normális vérképzést, és a környezeti hatásokhoz (infekció, trauma) történő megfelelő alkalmazkodóképességet.

I.1.1. A vérképzés helye, a vérképző sejtek, sejtvonalak

A csontvelő struktúrája és sejtösszetétele az életkorral és az anatómiai lokalizációval változik[1]. Az embrionális korban a szikzacskóból fokozatosan áttevődik a vérképzés a paraaortikus splanchnopleura és az aortaelágazás – gonádok – mesonephros területére. A 2.-3. hónapban innen vándorolnak a hematopoietikus őssejtek a májba és a lépbe, majd az 5. hónaptól fokozatosan a csontvelő veszi át a vérképzést, s a születés után már kizárólag ez utóbbiban történik. A fiatal szervezetben szinte az összes csont velőürege tartalmaz aktív csontvelőt. Rágcsálókban ez megmarad a felnőtt állatokban is, főleg a hosszú csöves csontokban. Emberben és a nagyobb gerincesekben az aktív csontvelő a lapos (koponya, sternum, bordák, medence) csontokra, bizonyos trabekuláris csontokra (csigolyák, kéz- és lábtőcsontok), valamint a hosszú csöves csontok epifíziseire korlátozódik[2]. Habár a csontvelő a szervezet csontjaiban elszórva található meg, mégis egységes szervrendszerként viselkedik. A hematopoietikus állomány nagyobb mezők vagy kisebb szigetek formájában foglalja el a velőüreg perifériás részeit. Míg az őssejtek főleg a csontfelszín közelében találhatóak, addig az érett sejtek a centrális véna körül helyezkednek, megkönnyítve a kiáramlás folyamatát[2].

A vérképzés négy fő sejtmegújító rendszerből áll: az eritropoiezisből, a mielopoiezisből, a limfopoiezisből és a trombopoiezisből (1. ábra)[3-4].



1. ÁBRA: A vérképzés sejtvonalai, a különböző sejttípusokra jellemző immunfenotípusokkal, egérben és emberben. *Az általunk használt markereket pirossal jelöltük. CLP: közös limfoid progenitor, CMP: közös mieloid progenitor, DC: dendritikus sejt, GMP: Granulocita-makrofág progenitor, MEP: megakariocita-eritroid progenitor (Forrás: [4] alapján összeállítva).*

A sejtmegújító rendszerekben alapvetően kétféle sejtosztódási folyamat zajlik az őssejtek szintjén: egyrészt önmaguk replikálásával tartják fenn a rendszer állandóságát, másrészt pedig az egyidejű prekurzor-leánysejtek képzésével az elpusztult vérsejtek utánpótlását biztosítják[2]. Ez utóbbi sejtek egynéhány osztódáson még átesnek, majd elvesztik osztódási képességüket és differenciálódnak, azaz folyamatosan érnek és felveszik a sejttípusra jellemző funkcionális sajátosságaikat.

Különbség figyelhető meg a különböző sejtvonalak érési kinetikájában. Azt az időt, amely a fiatal sejtek érése során az összes differenciálódási stádiumon való áthaladásukhoz szükséges, tranzitidőnek nevezzük[2]. A tranzitidők és így az egész

vérképző rendszer megújulási ideje a sejtek mitotikus aktivitásától és ciklusidejétől függ. Így míg a teljes mielopoiezis emberben 9-10 napig tart (egérben 3-5 napig), addig az eritropoiezis kb. feleannyi idő alatt zajlik le[2].

Az egyes vonalak érési folyamatai nem meghatározott anatómiai határokon belül történnek. Az érett alakok könnyen azonosíthatóak akár mikroszkóposan, de a fiatalabb előalakok pontos kategorizálása ily módon már lehetetlen. A sejtek azonosítására ma már az immunfenotipizálást használják a sejtek felszínén megjelenő, és az érettségük szerint változó markerek segítségével (lásd később)[4-5].

I.1.2. A hematopoietikus őssejt

Ahogy azt már említettük, valamennyi hematopoietikus sejt egy közös előalakból, a vérképző őssejtből fejlődik ki (lásd 1. ábra)[6-7]. A hematopoietikus őssejt szinonímái: HSC (hematopoietic stem cell), PHSC (primitive or pluripotent hematopoietic stem cell), PSC (pluripotent stem cell). A vérképző őssejtek jellemző funkciói az önmegújuló képesség, az osztódás, valamint a maximális differenciálódási kapacitás, ami által a csontvelő teljes regenerálására képes. Az őssejtek egész életen keresztül fennmaradnak (perzisztálnak) és biztosítják a vérképzést. Hosszú életidejű, többnyire nyugalomban, G_0 fázisban levő sejtek, ezért kevéssé érzékenyek környezeti hatásokra és 5-fluorouracil vagy ciklofoszfamid kezelésre, hiszen ezek támadáspontjai az osztódó sejtek. Közülük is legérzéketlenebbek a legősibb, hosszútávú repopulációs kapacitással rendelkező sejtek. Mennyiségük igen kevés: míg egerekben kb. 4-8 sejt található minden 10^5 normál csontvelői sejt között, addig az emberben ez az arány mindössze 3 /10^7 sejt[8-9].

A hematopoietikus őssejtek definíciója jelentős revíziókon ment keresztül az utóbbi két évtizedben. Újabban, a hosszútávú transzplantációs kísérletek alapján a vérképző őssejtek klonális diverzitás modellje a leginkább elfogadott[10-14]. Ebben a modellben az őssejt-kompartment meghatározott számú, különböző típusú őssejtet tartalmaz, melyek mindegyike genetikusan és epigenetikusan előre programozott funkciók szerint viselkedik. Ez alapján az egyes őssejtek, amikor programjuk szerint osztódni kezdenek, kb. 55-60 osztódási cikluson mennek keresztül, melyek közül mindössze az utolsó 4-5 osztódás zajlik a morfológiailag is elkülöníthető érési stádiumban[15]. Az azt megelőző osztódási ciklusokban lévő sejtek alkotják az őssejt-

kompartment osztódó őssejt-populációját. A klonális diverzitás modellje ellentmond annak a korábbi feltevésnek, miszerint egyetlen típusú vérképző őssejt létezik, amely folyamatosan különféle altípusú őssejteket képezhet.

A hematopoietikus őssejt morfológiai jellemzése nagyon nehéz, ez alapján nem azonosítható a csontvelőben mikroszkóp alatt[16]. Kimutatására elsősorban funkcionális teszteket használnak, melyek az őssejtek önmegújuló képességén alapulnak, amivel önmagukban is képesek a komplett vérképzés létrehozására teljes csontvelő ablációt követően. Erre a hosszútávú repopulációs képesség vizsgálatára olyan *in vivo* vizsgálatok léteznek, mint a lépkolónia-assay (colony-forming unit-spleen, CFU-S), a non-kompetitív és kompetitív csontvelő-transzplantációs vizsgálatok és a sorozat-transzplantációk[5,17-22]. Ezek mindegyike a hematopoietikus stresszt követően méri a saját vagy graft őssejtek kolonizációját.

A vérképző őssejtek *in vitro* vizsgálati rendszereiben az a közös, hogy a csontvelői strómát modelláló környezetet használnak, megfelelő táptalaj, növekedési faktorok és citokinek, vagy akár sejtek felhasználásával. Ezzel lehet a nyugvó őssejteket osztódásra és kolóniaképzésre késztetni. Ezen módszerek közül kiemelendő a különböző sejtvonalak differenciálódásának vizsgálatára alkalmas kolónia-formáló (CFU) assay. Az önmegújulási képesség analízisére alkalmazzák továbbá a hosszútávú regenerációt indukáló sejtek vizsgálatát (long-term initiating cell [LT-IC] assay), az őssejtek hígítási sorával történő oltást (limiting dilution assay), valamint az úgynevezett „macskakő sejtkultúrákat” (cobblestone-area-forming cells [CAFC] assay)[5,9,19-22].

Az előző, funkcionális teszteken kívül felszíni markerek kimutatása alapján, immunológiai módszerekkel (flow citometriával, immunhisztokémiával, fluoreszcens mikroszkóppal) lehet az őssejteket beazonosítani. Ami a fenotípusukat illeti, a vérképző őssejteket a kis méretük, a sejtvonalakat meghatározó felszíni markerek (Lineage [Lin] markerek) hiánya, a vitális festékekkel (rhodamine 123, Hoechst 33342) való gyenge festődésük, valamint a felszínükön specifikusan megjelenő antigénmarkerek alapján lehetséges. Ez utóbbiak többsége a hematopoietikus és immunsejtekre jellemző differenciálódási markerek (cluster of differentiation, CD) csoportjába sorolhatók, úgy mint a CD34, CD38, CD45, CD90, CD117 (Ckit), CD133, vagy a CD150 (Slamf1), de ide tartozik a Sca1 és a Thy1.1 is[4-5,7,9,15,23-25]. Az őssejtek nem expresszálják a sejtvonal-elköteleződés során megjelenő felszíni markereket, ezért Lin negatívként (Lin-)

jellemezzük őket. A Lin markerek közé tartoznak a mieloid (CD11b, Gr-1), az eritroid (Ter119), a B-limfoid (B220, CD19), és a T-limfoid (IL7Ra, CD3, CD4, CD5, CD8) markerek. Az őssejtek azonosítására és dúsítására szolgáló módszerek is ezen antigének kombinációit használják az érett sejtek kiszűrésére[25-26].

Itt kell megemlíteni, hogy az emberi és az egér vérképző őssejtek immunfenotípusa különbözik egymástól[11]. Így tehát míg az egér vérképző őssejt a CD34-/lo/Sca1+/Thy1.1+/CD38+/Ckit+/CD150+/CD48-/CD244-/Lin- immunfenotípussal írható le, addig az emberi őssejtre a CD34+/CD59+/Thy1+/CD90+/CD38$^{lo/-}$/Ckit+/CD133+/Lin- fenotípus jellemző[27-30].

Az 1. ábrán feltüntettük mind az emberi, mind az egér vérképzésében szereplő fő sejtcsoportokra jellemző immunfenotípusokat. Mindazonáltal meg kell jegyeznünk, hogy továbbra sincs egyetértés az őssejtkutató társadalomban a pontos nomenklatúrákat és immunfenotípusokat illetően. Ez főleg a legősibb, és legnehezebben beazonosítható sejtekre vonatkozik, amelyeket különböző technikákkal sem tudnak teljesen tisztán szeparálni.

Tovább bonyolítja a kérdést az is, hogy a sejtfelszíni fehérjemintázatot nemcsak a differenciáltsági állapot, hanem a sejt funkcionális állapota, pl. a sejtciklus is befolyásolhatja. Jó példa erre a Ckit expresszió, amely Doi munkacsoportjának vizsgálatai szerint nagymértékben függ a sejtciklus fázisától: habár a vérképzőszervi őssejtek Ckit pozitivitást mutatnak, a proliferálódó progenitorokon nagyobb mértékű expresszió detektálható, mint a G_0 fázisban lévő primitív őssejteken (Ckit^{low} fenotípus)[31]. Ugyancsak a Ckit expresszió mértékének változása detektálható *in vitro* sejttenyésztéskor, az alkalmazott növekedési faktorok hatására, alátámasztván, hogy a Ckit indukciója jelentős szerepet tölthet be az őssejtek aktiválásában, hiszen a Ckit ligandja, az őssejt-faktor (stem sell factor, SCF) képes a nyugvó sejteket újra ciklusba hozni.

Az eddigiek alapján láthattuk, hogy az őssejt-populáció nem egységes, az őssejtek több típusa alkotja. Regenerációs képességük alapján két fő őssejt-csoportot különböztetünk meg. Az úgynevezett hosszútávú repopulációs kapacitással rendelkező (long-term repopulating, LTR) sejtek, melyek regenerációs képessége meghaladja a 2 évet, gyakoriságuk a csontvelőben 0,01-0,02 %[7,9,32]. Ezek főleg nyugvó, G_0 állapotban lévő sejtek, mindössze 1-3 %-uk osztódik[33], proliferációjuk sebessége igen kicsi: egy

replikációt 2.5-4 héten belül visznek végbe[8-9]. Szinonímái az LT-HSC és a p-HSC, azaz primitív őssejtek. A másik csoportot a rövidtávú repopulációs kapacitással rendelkező (short-term repopulating, STR) sejtek alkotják. Ezek felelnek meg a CFU-GEMM-nek, egy valamivel elkötelezettebb, de még mindig multipotens, aktívan osztódó sejttípusnak, melyek a gyors hematopoietikus válaszért felelősek. Génexpressziós profiljuk és a tulajdonságaik megfelelnek aktív ciklusbeli állapotuknak[30,34-35]. Előfordulási gyakoriságuk a csontvelőben 0,02-0,08 %[9,15]. További megnevezései az ST-HSC és a t-HSC, azaz tranziens őssejtek, ugyanis ezek a sejtek mindössze néhány hónapig osztódnak. Ugyanakkor hatékony osztódásuk miatt kedvezőbben alakul a csontvelőben való megtapadásuk, ezért autológ őssejt-transzplantációhoz és génterápiában leginkább ezeket az STR (pontosabban a CD34+) sejteket használják fel.

Mivel e két sejttípus különböző aktivitással osztódik, ezért a funkcionális vizsgálatuk is eltérő: míg az LTR sejtek működését igazán csak csontvelő-transzplantációval vagy hosszútávú kultúrákkal lehet vizsgálni, addig az STR sejtek analízisére kiváló a CFU assay. Irving Weissman munkacsoportja volt az első, aki sikeresen izolálta az egér vérképző őssejteket 1988-ban, és aki először írta le a kétféle őssejtet meghatározó markereket[4]. Azóta számtalan ez irányban történt kutatás árasztotta el a nemzetközi szakirodalmat. Ezek alapján az LTR sejteket a CD34-/Sca1+/Thy1.1+/Ckit+/CD135-/CD150+/Lin- immunfenotípus jellemzi, míg az STR sejtek a CD34+/Sca1+/Thy1.1+/Ckit+/CD135-/CD150+/Lin- kombinációval írhatók le[4,7,36]. A dolgozatban bemutatott kísérletekben mi a Zhao és Osawa munkacsoportjai által kidolgozott azonosítási technikát követtük[37-38], így az LTR sejteket a CD34-/Ckit+/Sca1+/Lin-, az STR sejteket pedig a CD34+/Ckit+/Sca1+/Lin- immun-fenotípussal jellemeztük (lásd 1. ábra).

Az 1. táblázat összegzi azoknak a fő sejtfelszíni antigéneknek a tulajdonságait, amelyeket a vizsgálatainkban használtunk a hematopoietikus sejtek elkülönítésére.

1. TÁBLÁZAT: A primitív és elkötelezett hematopoietikus sejteken megjelenő néhány specifikus antigén. *([1,39] alapján összeállítva)*

antigén	sejt	ligand	Funkció	megjegyzés
CD34	•csv-i sejtek 1-4%-án: •HSC, •strómasejtek, •endotél	-L- és E-szelektin	•leukocita-endotél interakció	•CD34-deficiens egérben: -eozinofil akkumulációs zavar, -enyhe hematopoietikus defektus -nincs neutrofil vagy limfocita adhéziós/migrációs zavar,
CD117 (Ckit)	•csv-i sejtek 1-4%-án, ezek 50-70%-a CD34+ •monociták •leukémiasejtek •egérben: CFU-k	-SCF: •strómasejtek •fibrolasztok •egyéb szövetek	•hematopoiezis-szabályozás •eritroid, monocita-, myeloid-, és limfoid progenitorok proliferációja	•a Ckit felszíni receptor, Tyr-kináz aktivitással •a CkitL membránhoz kötötten és szolubilisen is aktív
Sca1(stem cell antigen, Ly-6)	•HSC		•Limfocita-érés (IL-4, IFNγ jelenlétéhez kötötten)	•IFNγ, TNFα indukálja az expresszióját
Lineage markerek				
CD11b (Mac-1)	•mieloid, •monocita, •makrofág, •NK-sejtek	-ICAM-1 -fibrinogén -LPS	•leukociták transzendoteliális migrációja •komplementrendszer része, bekebelezés	
Ter119 (Ly76)	•Eritroid sejtek: proeritroblaszt-érett eritrociták			
CD3 (TCR)	•érett T-limfocita		•T-sejt aktiváció	
B220 (CD45R)	•B-limfocita		•B-sejt aktiváció	

Az őssejtek további jelentős tulajdonsága a differenciálódás, amely során létrejönnek a specifikus sejtvonal antigénekkel (Lineage markerekkel) jellemezhető, elkötelezett (osztódó-érő) sejtek. Ezeknek megfelelően, *in vitro* differenciálódási kísérletekkel a következő csontvelői kolónia-formáló egységek alakulnak ki: CFU-E (eritroid), CFU-GM (granulocita-makrofág), CFU-MEG (megakariocita), CFU-Eo (eozinofil), CFU-B (bazofil), CFU-L (limfoid)[20]. Az elkötelezett sejtek érésük során elvesztik osztódási képességüket, és felveszik a sejtvonalra jellemző tulajdonságaikat (1. ábra).

Az érési folyamat során a sejtek a különböző kompartmenteken belül ténylegesen változtatják a helyüket, ezért az előzőeken túl az őssejteket a mobilitásra való képességük is meghatározza. Ennek érdekében a felszínükön megjelenítenek olyan fehérjéket, sejtadhéziós molekulákat is, melyek által a strómával kapcsolatot tudnak létesíteni (lásd alább)[40-42]. Ugyanakkor, mobilitásra való képességükkel - egyedülálló

módon - akár el is tudják hagyni a csontvelőt, összeköttetést teremtve a vérképző szervrendszeren belül. Embrionális és patológiás körülmények között, megfelelő stromális környezetet találva (pl. a májban vagy lépben) ugyanúgy kitapadhatnak és osztódni kezdenek, ezzel biztosítva az extramedulláris vérképzést[2,43]. Ezen képességük az alapja továbbá a csontvelő-transzplantációkat megelőző, perifériás vérből történő CD34+ őssejtgyűjtésnek.

Az eddigiek alapján láttuk, hogy a vérképzés „méhkirálynői" a hematopoietikus őssejtek, melyek alapvető funkciói határozzák meg a sejtek sorsát és a vérképzés kimenetelét. Mindazonáltal bizonyos knockout egérmodellekkel végzett megfigyelések arra engednek következtetni, hogy még az őssejtek alapvető funkcióinak károsodása esetén sem feltétlenül következik be pancitopeniás állapot. Ennek oka többféle, molekuláris kompenzáló mechanizmus lehet, melyek pl. az extramedulláris vérképzést vagy a csontvelői sejtproliferációt serkentik, így kielégítő vérképzést tud a szervezet elérni[44].

I.1.3. A vérképzés szabályozása

A vérképzés bonyolult rendszeréhez hasonlóan az őssejtek szabályozása is rendkívül komplex, melyben a mikrokörnyezet sejtjei, citokinek, receptorok, jelátviteli folyamatok, génaktivációk és egyéb immunológiai mechanizmusok vesznek részt. Ahhoz, hogy a vérképző őssejt alapvető funkcióit (önmegújulás, osztódás, differenciálódás) megfelelően el tudja látni, pontosan szabályozott mechanizmusoknak kell együttműködniük, hogy eredőjük a szervezet igényeinek megfelelő sejtreakciót eredményezzen az őssejt részéről.

I.1.3.1. A csontvelői stróma

A stróma tulajdonképpen egy rácsrostokat tartalmazó kötőszövetes váz a velőűrön belül, mely strukturális és funkcionális alapot nyújt a vérképzősejtek megtelepedéséhez, és zavartalan működéséhez. A csontvelői strómasejt-hálózat biztosítja az aktív vérképzési zónát az osztódó-érő hematopoietikus sejtek számára. Ezen utóbbi sejtek beleágyazódnak a makrofágok, fibroblasztok, endotélsejtek, simaizomsejtek, T-limfociták, monociták, zsírsejtek, oszteoblasztok, oszteoklasztok, stb., valamint az

extracelluláris mátrix által közösen alkotott mikrokörnyezetbe. A stróma sejtjei nagyon lassan szaporodnak, többnyire a sejtciklus G_0 fázisában vannak[3,15].

A normális vérképzés alapvető követelménye a mikrokörnyezet funkcionális integritása, hiszen bonyolult kölcsönhatások révén befolyásolja a sejtosztódási és differenciálódási folyamatokat. Ezt nevezik a vérképzés instruktív szabályozásának. A stróma által termelt szabályozó molekulák, citokinek, lokális auto- és parakrin hatásain túl a szabályozás részét képezik az adhéziós molekulák révén közvetített direkt sejt-sejt kapcsolatok is[40-41].

A vérképző őssejtek nem tudnak proliferálni ha csak növekedési faktorokat, például GM-CSF-et (granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktort), IL-3-at (interleukin-3-at), vagy SCF-et adunk hozzájuk, de növekedési faktorok nélkül is osztódnak megfelelő stromális környezetben, amennyiben a direkt sejtkapcsolatok megtartottak. A CD34+ sejtek által expresszált felszíni molekulák között szerepel például a kollagén- és trombospondin-receptor CD36, valamint a vitronektin-receptorkomplex CD51/CD61, mely az extracelluláris mátrix fibrinogénjét, fibronektinjét, lamininjét, thrombospondinját, és a von Willebrand-faktort (vWF) is köti, és így szerepet játszik a sejtek kihorgonyzásában a strómához, illetve a leukocita-endotél interakciókban[23,40].

Az általunk vizsgált sejtfelszíni markerek is részt vesznek az őssejt-stróma kommunikációban. Míg a CD34 az endotélsejtek felszínén lévő szelektinekhez kötődik, addig a Ckit a strómasejtek felszínén megjelenő SCF-hez kapcsolódik[45-46]. Különféle tanulmányok vizsgálták ezen molekulák szerepét a vérképzésben, csontvelő-depressziót követően. Felfedték, hogy a stróma közvetítésével a különböző őssejtfunkciókban (osztódás, differenciálódás) játszanak moduláló szerepet, például 5-fluorouracil kezelést követően a Ckit termelése lecsökken, és ez tehető felelőssé a progenitorok mobilizációjáért[47-48]. Különböző integrinek defektusa esetén pedig a fokozott mobilizációval párhuzamosan késik a csontvelő regenerációja is[49].

I.1.3.2. Citokinek szerepe a hematopoiezis szabályozásában

A citokinek (limfokinek, kemokinek, interleukinek, növekedési faktorok) olyan szolubilis molekulák, melyeket sokféle sejt termel, pleiotróp hatásuk lokálisan, auto- és parakrin módon érvényesül, és egymással bonyolult kapcsolatban állnak[1,19].

A hematopoietikus kolónia-stimuláló faktorok (CSF) olyan citokinek, melyek egyes pluripotens illetve elkötelezett sejteket késztetnek osztódásra és meghatározott irányba való differenciálódásra. A vérképzés szabályozásában szerepet játszó anyagok főleg a csontvelő hematopoietikus mikrokörnyezetének sejtjeiben (a strómasejtekben), részben pedig a periférián, a májban, vesében, érett T-limfocitákban termelődnek[50]. A szolubilis molekulák a már leírt auto- és parakrin módon hatnak, azonban a citokinek jelentős része a strómasejtek felszínéhez, illetve az extracelluláris mátrixhoz kötötten találhatók, így mintegy kihorgonyozzák az osztódó-érő sejteket, és „irányítják" útjukat a csontvelőben.

Hatásuk alapján csoportosítani lehet a hematopoietikus növekedési faktorokat:

I. típusú hematopoietinek	IL-3, GM-CSF	Direkt hatásuk van bizonyos sejttípusokra.
II. típusú hematopoietinek	IL-1, IL-4, IL-5, IL-6	Intrinsic kolóniastimuláló hatásuk nincs.
III. típusú hematopoietinek	IL-1, IL-2, TNFβ, IFNγ	Más CSF-ek felszabadulását serkentik, közvetve szabályoznak.

A citokineket az általuk befolyásolt sejteknek a csontvelői hierarchiában elfoglalt helye alapján is lehet csoportosítani:

Pluripotens őssejtekre hat	SCF, IL-3
Multilineage, multipotens sejtekre hat	GM-CSF, IL-6
Érettebb, elkötelezett sejtekre hat	G-CSF, M-CSF, IL-5, EPO, TPO
Strómasejtekre hat	IL-1, TNFα (serkentik a GM-CSF, G-CSF, M-CSF és IL-6 termelését)

A vérképző sejtek *in vitro* vizsgálatai terén az utóbbi évtizedekben bekövetkezett jelentős fejlődés adott lehetőséget arra, hogy a különböző citokinek hatásait pontosan meghatározhassuk, a jelátviteli mechanizmusait feltérképezhessük. Egyes citokinek, például az SCF és az IL-3, melyek a legősibb sejtekre fejtik ki hatásukat, az őssejtek kolónia-fenntartó, önmegújító osztódásában játszanak szerepet[51-52]. Más faktorok viszont inkább felfüggesztik az önmegújítást, és a sejtek differenciálódási folyamatait indítják be. Ide tartozik például a leukémia-gátló faktor (leukemia inhibitory factor, LIF, IL-6), melyek bizonyos egér mieloid (M1) sejtvonal sejtjeit differenciálódásra késztetik makrofág irányba[53], vagy a G-CSF és a GM-CSF, melyekkel, ha megkezeljük a sejtvonal sejtjeit, azok granulocita illetve makrofág irányban fejlődnek tovább[51].

Ezeken kívül rengeteg (legalább 30-féle) citokinről derült ki, hogy befolyásolják ugyan a vérképző sejtek működését, de önmagukban nincsen meghatározó szerepük a vérképzés alapvető kimenetelére. Ilyenek például egyes interleukinok, a trombopoietin

(TPO), valamint az interferon (IFN), a tumor nekrózis faktor (TNF), és a transzformáló növekedési faktor (TGF) család bizonyos tagjai. Az általuk kialakított, pontosan összehangolt citokin-hálózat azonban a normális vérképzés fenntartásán kívül lehetővé teszi, hogy a csontvelő megfelelően tudjon reagálni változó környezeti stresszhatásokra, úgymint fertőzésre vagy traumára.

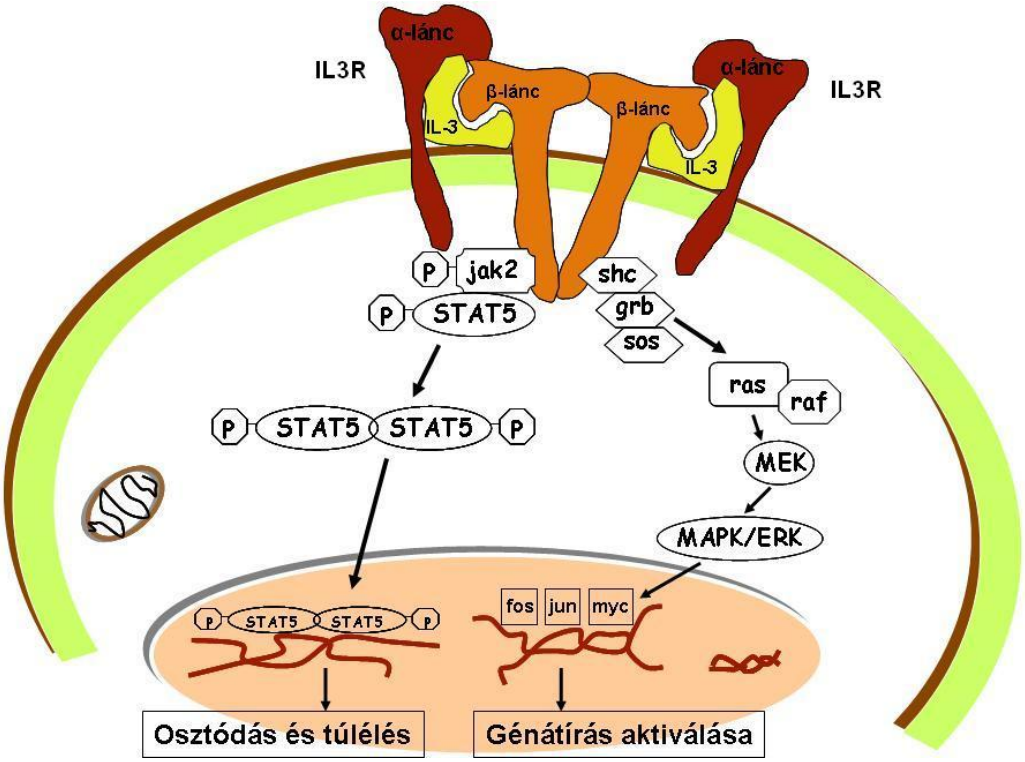
Manapság már számos hematopoietikus faktort, pl a G-CSF-et, az EPO-t vagy az IL-3-at alkalmazzák a klinikai gyakorlatban a vérképző ős- és progenitorsejtek stimulálására, olyan esetekben, amikor a csontvelő súlyosan szupprimált állapotba kerül, például kemoterápiát követően vagy kongenitális neutropeniában[54-57].

I.1.3.3. Az interleukin-3 (IL-3) és jelátvitele

A főleg helper T-limfocitákban és strómasejtekben termelt, 20-26 kDa tömegű IL-3 a hematopoiezis egyik legfontosabb korai szabályozó citokinje: multi-CSF-ként a legősibb sejtekre és a fiatal előalakokra hat, azokat osztódásra, majd érésre készteti[51]. És így, mint korai faktor az IL-3-nak alapvető szerepe van tulajdonképpen minden sejtvonal fejlődésében. Hatására a granulocita-, monocita-, eritrocita-, limfocita- és thrombocitatermelődés egyaránt fokozódik[36,58]. Az IL-3 a Ckittel együtt szükséges a nyugvó, primitív őssejtek túléléséhez[59]. Az IL-3-at rutinszerűen használják *in vitro* kísérletekben a vérképző sejtek fenntartására és osztódásuk stimulálására. Megjegyzendő, hogy azon túlmenően, hogy az SCF-hez hasonlóan nagyban megnöveli a kolónia-formáló egységek számát, az IL-3 mindenképpen kell a kolóniák, főleg a BFU-E maximális fejlődéséhez is[60].

A 2. ábra összegzi az IL-3 fő jelátviteli útvonalait. Receptora, az IL3R, a gp140 receptorcsaládba tartozik. IL3R-t mutattak ki érett perifériás sejteken, eozinofileken, B-sejteken, valamint különböző csontvelői fejlődési alakokon, CD34+ sejteken, a mieloid vonal sejtjein, valamint különféle leukémiás sejtvonalakon[58]. Az IL3R két láncból áll, a specifikus, 60-70 kDa tömegű alfa láncból (IL3Ra), és a nem specifikus, 130-140 kDa tömegű béta láncból (IL3Rb). Ez utóbbi megtalálható a GM-CSF és az IL-5 receptorában is, ezért közös láncnak nevezik[61-62]. Az alfa alegység extracelluláris ligandfelismerő, a béta lánc pedig intracelluláris jelátvivő molekulákat aktiváló doménnel rendelkezik. Az IL-3 bekötődése a receptor alegységek hetero-dimerizációját indukálja. Ezzel párhuzamosan a béta lánc többféle szignálmolekulát köt meg, mint

például a janus arcú kinázokat (JAK), STAT (signal transducer and activator of transcription) fehérjéket, src-kinázokat, az Shc-t, vagy a foszfatidil-inozitol kinázt. A béta lánc szükséges bizonyos proliferáció-asszociált gének (c-myc, pim-1, oncostatin-M, c-fos, c-jun) indukciójához[51]. A béta lánc genetikai hiánya azonban mégsem okoz drámai defektust a vérképzésben, ami felveti a többi citokin kompenzáló szerepét az IL-3, az IL-5 és a GM-CSF funkciójának kiesése esetén[63-64]. Az alfa lánc a ligandfelismerő funkcióján túl szükséges a STAT5 aktivációhoz, valamint a c-fos és a c-jun transzkripciós indukciójához[51,65].



2. ÁBRA: Az IL-3 fő jelátviteli útvonalai. *(Forrás: [51] alapján összeállítva)*

Az IL3R aktivációja két fő jelátviteli utat indít el a sejtben. Az egyik a JAK/STAT útvonal, melynek a központi szabályozó molekulái az úgynevezett STAT fehérjék[65,66]. Ezidáig összesen hat különféle STAT fehérjét azonosítottak. Ezek közül a STAT5-nek tulajdonítanak központi szerepet a hematopoietikus funkciók szabályozásában. A STAT5 két izoformában létezik, ezek a STAT5a és a STAT5b, melyek mind szerepet játszanak az IL-3/IL-5/GM-CSF-indukált őssejt-proliferációban[67]. A STAT5 egy központi jelátvivő molekula, melyet nem csak az IL-3, hanem számos egyéb korai szabályozó valamint késői, sejtvonal-specifikus citokin is

aktivál, például a TPO, az IL-6, az SCF, vagy az Flt3L, melyek mindegyikéről kimutatták, hogy az őssejteket *in vitro* sejtkultúrákban fenntartani képesek[65,68]. A STAT5 szabályozása lehet az a pont, amellyel ezek a faktorok egymás hatásába beavatkoznak.

Az IL3Rb aktivációját követően a JAK a tirozinján foszforilálja és ezáltal aktiválja a STAT5-öt, mely dimerizálódik, a sejtmagba vándorol, majd ott a target génjeit aktiválja. Ilyen target gének például a c-fos, c-myc, pim-1, ciklinD1, p21, cis, bcl-2, vagy az oncostatin[51,65,67]. Ezek főleg sejtciklust szabályozó és antiapoptotikus gének, valamint számosat közülük az LTR őssejtek önmegújító osztódásával hoztak összefüggésbe.

A STAT5 megfelelő aktivációja tehát szabályozza a vérképző sejtek működését, a sejtosztódást és a differenciálódást is. Folyamatos aktivációja hematológiai, főként mieloid malignitásokat, a CD34+ sejtek megnövekedett repopulációs kapacitását, valamint az eritroid vonal túlburjánzását eredményezi[65,69-70]. A STAT5 génkiütött egerek csontvelői őssejtszáma pedig markánsan lecsökken, vérképzésük súlyosan elmarad a csontvelő-regeneráció során[44,68,71-74]. Bizonyos sejtvonalakban pedig, melyek funkcióját ellátni képtelen STAT5 fehérjét expresszálnak, az IL-3-indukált sejtosztódás gátolt[67]. Tehát a STAT5 szükséges a növekedési faktorokra adott megfelelő sejtválaszokhoz.

Az IL-3 más szignál útvonalakat is aktivál, úgymint a Ras/ MAPK (mitogen-activated protein kinase) útvonalat, melyet szintén kapcsolatba hoztak számos vérképző sejttípus osztódásával, túlélésével, és differenciálódásával[75-77]. Az IL3Rb által megkötött Shc adapter molekula foszforilálódik, aktiválja a Ras útvonal átvivő fehérjéit (többek között a MAPK családhoz tartozó ERK fehérjéket). A kaszkád aktivációja a c-fos és c-jun transzkripciós faktorok megnövekedett expresszióját eredményezi.

Egyes országokban az IL-3-t alkalmazzák a gyakorlatban is: neutropenia, aplasztikus anémia esetén, kemoterápia és transzplantáció után, a pancitopenia kivédésére, illetve a megmaradt sejtek stimulálására és életben tartására[56-57].

I.1.3.4. Az őssejtek génszintű szabályozása

Láthatjuk, hogy a számos szabályozó faktor milyen bonyolult jelátviteli útvonalakon és kölcsönhatásokon keresztül modulálja a vérképző sejteket. Így tehát az ős- és

progenitorsejtek alapvető funkcióit nem pusztán egy komplex citokinhálózat befolyásolja, hanem a sejtek maguk által meghatározott, és a citokinek által modulált génexpressziós hálózat[78]. Ez utóbbit nevezzük a vérképzés intrinsic szabályozásának.

Egyre növekszik azon közlemények és microarray adatok száma, melyek a csontvelői őssejtek, ezen belül is különösen a CD34+ sejtek génexpressziós profilját mutatják be. Ezek által nyilvánvalóvá vált, hogy számos gén hozható kapcsolatba a vérképzés szabályozásával. Ilyenek a sejtciklus regulációjával (Chek1, ciklinD2, cdk4), a sejtosztódással (Flt-3, Hoxa9, Gata-2), a különböző sejtvonalak iránti elköteleződéssel (Gata-1,3), a metabolikus aktivációval valamint a kemokinekkel és adhéziós molekulákkal (Vla4, a4-integrin) kapcsolatos gének[35,79-82]. Külön problémakört képez a legősibb sejtek önmegújulási folyamatainak szabályozása. Bizonyos transzkripciós faktorokon (Wnt, Hoxb4) túl, sok molekuláris reguláló mechanizmus (Notch, Bmi-1, p21, p27, telomeráz) a sejtciklus G_1-S átmeneténél hat, ami meghatározhatja a sejt döntését a sejtmegújító osztódás vagy a differenciálódás irányába[14,83-84]. Knockout egérmodellekkel végzett kísérletek azonban felfedték, hogy az egyes gének hiánya nem okoz alapvető vérképzési defektust, amit a sokféle kompenzáló és egymással átfedésben lévő mechanizmus magyaráz.

Patológiás esetben további mechanizmusok génjei is aktiválódnak. Besugárzást illetve 5-fluorouracil kezelést követő csontvelő-regeneráció során a kezdeti stressz további géneket aktivál, melyek a sejthalálban (Bax, Tnfrsf10), a sejtciklus megállításában (p21, cdc25), és a DNS-javító mechanizmusokban (Btg2, Gadd45A) játszanak szerepet[85-87].

I.1.4. A besugárzás hatása a vérképzésre

I.1.4.1. A csontvelő károsodása és regenerációja

Kísérleteinkben teljestest-besugárzást alkalmaztunk, hogy a csontvelőt kimerítsük, és regenerálódásra késztessük. Ezért szükséges, hogy megértsük, milyen folyamatok zajlanak ionizáló sugárzást követően.

Egyszeri teljestest-besugárzásnál ***akut sugárbetegség*** alakul ki[43]. Ekkor a szöveti sugárérzékenység függvényében, a különböző dózisoknál más-más szervrendszer károsodásának tünetei kerülnek előtérbe: így emberek esetében 0.8-1.0 Gy-nél a

legérzékenyebb csontvelő sérül (*hematopoietikus szindróma*), 10-50 Gy-nél már az emésztőcsatorna sérülése a klinikai szempontból a domináló (*gasztrointesztinális szindróma*), végül ennél nagyobb dózisoknál a legrezisztensebb idegrendszer károsodásának tünetei mellett történik az elhalálozás (*cerebrovaszkuláris szindróma*). Az egerek rezisztensebbek a sugárzásra, az emberihez hasonló tünetek kialakításához kb. másfélszer magasabb dózisra van szükség, így a kísérleteinkben alkalmazott 4 Gy-nél még nincs számottevő gasztrointesztinális hatás, ami befolyásolná az állatok sorsát. A csontvelői szindrómában a besugárzás hatását objektíven detektálni lehet: megváltozik a perifériás vérkép összetétele, az egységnyi csontvelőterületre eső sejtszám, valamint a lép tömege és cellularitása (összsejtszáma).

Az ionizáló sugárzás hatásmechanizmusának alapja, hogy nagy energiáját átadja a sejt komponenseinek[88]. Így direkt vagy indirekt módon (vízmolekulából képződött szabadgyökök közvetítésével) károsodnak a sejt számára létfontosságú makromolekulák. Ezek közül is legfogékonyabb a fellazult, osztódás állapotában levő (S-fázisú) DNS, aminek következménye mutáció és abnormális repair. A proliferáló sejtek (azaz a hematopoietikus, gasztrointesztinális, epidermális őssejtek) ciklusában blokk következik be, mely, ha a károsodás javítható, akkor csak mitotikus késésben jelentkezik, ha nem, akkor végül a sejt halálában. A másik érzékeny sejtkomponens a lipidmembrán, melyben sugárzás hatására lipidperoxidáció, szabadgyökképződés és fragmentáció következik be, ez okozza a halálát az intermitotikus, azaz a G_1 illetve G_0 fázisú sejteknek (például a legősibb, nyugvó állapotban lévő őssejteknek, vagy az érett endotél-, fibroblaszt-, simaizom-, és májsejteknek)[3]. A képződött oxigéngyökök a közvetlen szövetkárosító hatásukon túlmenően a szöveti gyulladás folyamatában is fontos tényezők[43,89]. A gyulladásban további jelentős tényező a különböző citokinek aktivációja. Feltételezhető, hogy a sugárzás az indirekt, gyulladás-indukált sejtaktiváció mellett esetleg direkt módon is hat a citokinek génexpresszójára, így növeli meg a szintézisüket[85,88,90-91]. A megváltozott citokinkörnyezet okozza az ún. szomszédsági (bystander) hatást, ami által a sugárhatás lokálisan felerősödik[90-91].

A sugárzás-indukált szövetkárosodás tehát sok tekintetben a gyulladással analóg folyamat, ami az ionizáló sugárzás sejtet, extra- illetve intracelluláris makromolekulát károsító, szabadgyökképző hatásán, és egyéb indirekt immunológiai mechanizmusokon alapszik. Ezek a hatások a csontvelő összes sejtjében érvényesülnek, de mivel a

különböző sejttípusoknak más-más a ciklusidejük, másképpen reagálnak, és a domináló kép is ennek függvényében alakul. Habár a vérképző őssejtek sugárérzékenysége magas, tovább bonyolítja a képet az a tény, hogy differenciáltsági és sejtciklusbeli állapotuk is nagymértékben befolyásolja az aktuális válaszkészségüket. Mindezeken felül a sugárzás károsító hatását jelentős mértékben befolyásolja a csontvelő oxigénellátottsága, a mikrokörnyezet és a vaszkuláris rendszer állapota is[2,18,90,92-93].

Besugárzást követően jellemzően megváltozik az őssejtek génexpressziós mintázata[85,87,90,94]. A stresszhatást követő 1. napon a ciklus leállását („arrest"-et) okozó és antiproliferatív gének aktiválódnak (p21, Btg3, bax, Timp3 stb). A 3. napon a DNS repair mellett már a replikáció génjei is aktívak (Ki67, Chek1, a4-integrin), a 6. napon már detektálhatók a metabolikus aktiváció génjei (CiklinB2, Sca1, CD48) is, végül a 10. napon az antiproliferatív gének aktiválódásával (Btg1, Socs3) kezd visszaállni a nyugalmi génexpresszió.

A sugárzás molekuláris hatásai tehát elsősorban az osztódó sejteken érvényesül, és így a sejtek élettani funkcióit is befolyásolja. A DNS sérülése apoptózist vagy nekrózist indukál, vagy még ha nem is pusztul el a sejt, akkor is osztódásában megáll, bár a migrációt a csontvelőn át folytatja. Ez a mitotikus késlekedés és a proliferáló sejtkészlet inaktiválása a csontvelői összsejtszám dózis- és citokinparaméter-függő csökkenéséhez vezet.

A besugárzásra adott válasz a dózison kívül nagyban függ a sejt típusától, sugárérzékenységétől, és a sugárártalomra adott válasz jellegétől. Magasabb dózisoknál (egérben 4 Gy felett), a nekrózis dominál, mert ilyenkor már az apoptózis kifinomult és összehangolt folyamatainak elemei is súlyos károsodást szenvednek[3].

Alacsonyabb dózisoknál azonban főleg az apoptotikus mechanizmusok aktiválódnak. Mint azt már az előzőekben említettük, az ionizáló sugárzás valószínűleg a direkt magkárosítás (és c-myc expresszió) révén idéz elő az apoptózist, de szerepe lehet ebben a lipidmembránok sérülésének, és egyéb citoplazmatikus és nukleáris folyamatoknak is, melyek beindítják valamely apoptotikus útvonalat. Az apoptózis vagy programozott sejthalál azt a folyamatot jelöli, amiben a sejt aktívan részt vesz saját pusztulási folyamataiban, és ami magába foglalja a károsodás felismerésére irányuló és a programozott, genetikai választ kivitelező mechanizmusokat. Ezek a folyamatok

jellegzetes morfológiai és intracelluláris molekuláris változásokkal járnak, melyek különböző immunbiológiai módszerekkel mérhetők[95-96].

Ezek közül kiemelnénk a sejtfelszíni, TNF receptorcsaládba tartozó CD95 (Fas) receptor által indukált útvonalat. A vérképző őssejtek expresszálják a CD95-t a felszínükön. A sejtek CD95-indukált apoptózis iránti érzékenységét leginkább a hematopoietikus környezet és a szabályozó citokinek (IFNγ, TNFα) befolyásolják[97-99]. Mindazonáltal, egyes adatok szerint az ionizáló sugárzás direkt módon is képes CD95 expresszió növekedést okozni[100-102]. A Fas receptor ligandja (FasL) a receptorok aggregációját okozza, és beindítja az intracelluláris proteolitikus kaszkádfolyamatokat, melynek része a különböző kaszpáz enzimek (kaszpáz-1-14) aktivációja. Ezek közül a legjelentősebb a kaszpáz-3, mint fő effektor apoptotikus molekula. Az aktiváció eredményeként több, apoptózishoz asszociált gén (ced-3, ced-4, bax, p53) expresszálódik, és sejtek G_1 és G_2 állapotban leállnak[103-104]. A továbbiakban a kromatinállomány kondenzálódik, és a DNS fragmentálódik. Ezek a folyamatok a besugárzást követően 2-9 órával kulminálódnak, ekkor láthatunk piknotikus magokat a csontvelői sejtekben, ami az apoptózis folyamatainak végső stádiumát jelzi.

Az apoptózis elleni védelemben számos citokin vesz részt a csontvelőben. Általánosan elmondható, hogy minden olyan tényező, mely a sejtek osztódását elősegíti, az apoptózis ellen hat. Tehát a korai citokinek (főleg az EPO, az IL-3 és az SCF) megfelelő kombinációban nemcsak a vérképző sejtek osztódásához és differenciálódásához szükségesek, hanem korai és elengedhetelen tényezők abban is, hogy a sejtek ne apoptotizáljanak[105-109]. Brandt és munkatársai szerint, amíg az IL-3 a CD34+/DR+ őssejtek túlélését segítette elő, ezen belül is leginkább a BFU-E és a CFU-GEMM sejtekét, addig az SCF-nek főleg az ezeknél primitívebb sejtek túlélésében volt szerepe, de a kettő hatása mindenképpen összekapcsolódik[36]. Számos irodalmi adat támasztja alá azt, hogy besugárzást követően korai, antiapoptotikus citokinek (SCF, TPO, FLT3L, IL-3) koktélját alkalmazva nagymértékben segíthetjük a vérképző őssejtek túlélését és a csontvelő regenerációját[91,105]. Egyes adatok szerint ezt a hatást a CD95 közvetíti[95].

Meg kell jegyezni, hogy apoptózis a csontvelőben nem csupán besugárzást követően észlelhető, hanem részese a normális őssejtfunkcióknak, amennyiben szabályozza az őssejtek számát a fiziológiás nyugalmi helyzet fenntartásához[9,95,110]. Az

előzőek alapján, tulajdonképpen a citokinek és az apoptózis folyamatainak egyensúlya határozza meg a vérképző sejtek sorsát a hematopoietikus hierarchiában.

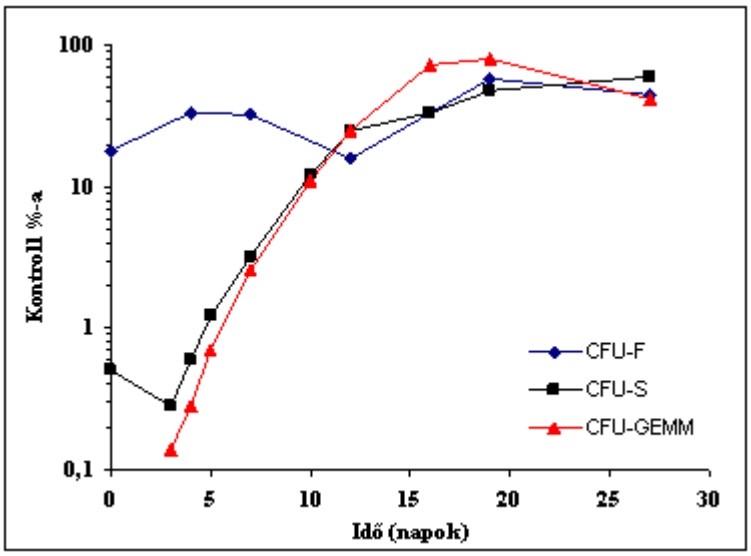
A besugárzást követően a csontvelői regeneráció három fázisban folyik le, ideje természetesen függ a sejtek ciklusidejétől, tranzitidejétől, és az utánpótlást biztosító megmaradt őssejtek számától[2].

A *degeneratív fázisban* (3-5. nap emberben, egérben rövidebbek a fázisok) először granulocitózis észlelhető, ami a csontvelői mobilizáció és az extramedulláris vérképzés eredménye. Ezt követően azonban a sejtszám - dózisfüggő módon - jelentősen lecsökken. Oka a szenzitív, osztódó őssejtek pusztulása és mitotikus leállása, valamint az osztódó-érő populáció pusztulása, mely ugyan kevésbé érzékeny, ám a direkt sugárhatás rajtuk is (főleg a fiatalabb alakokon) érvényesül, és az őssejtek egy ideig nem képesek utánpótlásuk biztosítására. Ennek megfelelően az első órákban a direkt sugárkárosodott, illetve a mitotikus leállás állapotban lévő sejtek száma megnő, majd néhány óra múlva megjelennek a mitózishoz köthető kromoszómaaberrációk (a sugárzás sztochasztikus, mutagén hatásaként), főleg a granulocitákban. Ezek az aberrált granulociták a perifériára a 4.-6. napon áramlanak ki (emberben)[3].

Ezután beindul a *kétfázisú regeneráció*. Az STR sejtek, noha érzékenyebbek a behatásra, ám számuk és proliferációs kapacitásuk is nagyobb, mint az LTR sejteké, gyors osztódásba kezdenek (5-30. napig)[48,82], azonban kb. 12 hét után kimerülnek[9]. Súlyos károsodás esetén korábban kimerülhetnek, és ha az LTR sejtek nem képesek addigra átvenni a regenerációt, akkor teljes csontvelői aplázia következik be. Ezt a folyamatot az *abortív emelkedés fázisának* nevezzük[2].

A 30. napon túl beindul az *effektív regeneráció,* amikor a különböző stimulusokra a sejtciklusba visszahozott, eredetileg G_0 fázisú, sugárrezisztens LTR sejtek veszik át az osztódó szerepet[32]. Egérben így szubletális 1.5 Gy dózist követően már a 7-8. napra normalizálódik az őssejt-populáció[92]. Ez a folyamat a csontvelő cellularitásának exponenciális növekedését, illetve a perifériára történő fokozott sejtkiáramlást eredményez. Mivel az osztódás és a kiáramlás üteme meghaladhatja az érés és differenciálódás ütemét, ezért a periférián éretlen sejtalakok jelennek meg. A kétfázisú regeneráció jól látszik a 3. ábrán, amely a CFU-S és CFU-GEMM sejtek összehasonlító regenerációs mintáját mutatja egérben, 4,5 Gy egésztest-besugárzást

követően[3]. Az STR sejteknek megfelelő CFU-GEMM sejtek elkezdenek hamar osztódni, azonban a kontroll éték elérése után kapacitásuk gyorsan kimerül (50 %-ra esik vissza). Ekkor az LTR kapacitással rendelkező CFU-S veszi át a szerepüket.



3. ÁBRA: CFU-F, CFU-S és CFU-GEMM sejtek regenerációja egerekben, 4,5 Gy egésztest-besugárzást követően, a kontroll %-ában. *(Forrás: [3] alapján összeállítva)*

Amint az az ábrán is jól látszik, a besugárzás hatással van a csontvelői stróma sejtjeire is. A stromális fibroblasztok progenitorai (CFU-F) ugyan kevésbé sugárérzékenyek, mint a hematopoietikus előalakok, ám a regenerációjuk jóval elhúzódóbb a lassúbb sejtciklusuk miatt. Az ábrán látható, hogy a CFU-GEMM és CFU-S sejtek rapid regenerációra képesek a megmaradt strómán, mégha a stromális prekurzor sejtek 10-30 %-ra csökkentek is. A CFU-F sejtek még mindig csak a kontroll 50 %-át érik el a 27. napon, amikor a vérképző sejtek repopulációja szinte már teljes. A fibroblaszt progenitorok száma kb. az 54. napra éri el az eredeti érték 90 %-át[3]. Bár a strómasejtek lassú turnovere miatt károsodásuk csak később manifesztálódik, a regeneráció kimenetelét illetően mégis kardinális szerepet játszanak az általuk termelt mediátorok, citokinek, és adhéziós molekulák fokozott vagy éppen csökkent termelésével[90,111-114].

Összefoglalva tehát, a besugárzást követően a csontvelői képet dominálja a vérképző őssejtek károsodása és pusztulása. Ennek hatására a tranzitidő elteltével (amit a sugárzás maga nem befolyásol) a periférián is észlelhető a fehérvérsejt-, trombocita- és vörösvérsejtszám csökkenése[90]. Klinikailag ez vérzés, a fertőzésekre való fokozott

hajlam, s hosszabb távon anémia formájában jelentkezik. A fehérvérsejtek közül legkorábban és legmarkánsabban a limfociták érintettek. Ez főleg a jelentős sugárérzékenységükből adódik, mivel maguk is poteciálisan osztódó sejtek. Ezen túlmenően megváltozik a morfológiájuk, migrációs képességük, és az adhéziójuk is, így az immunitásban betöltött szerepük is megváltozik (lásd később)[115].

A 2. táblázat foglalja össze a citotoxikus ártalmak hemopoietikus sejtpopulációkra gyakorolt komplex hatásait.

2. TÁBLÁZAT: **A citotoxikus ártalmak hatásának összegzése a hematopoietikus sejtek hierarchiájában.** *(Forrás:[3]alapján összeállítva)*

	Őssejtek (HSC)	Tranzit sejtek	Érett sejtek
Sugárérzékenység	magas, kivéve a legősibb sejteket	CFU-E - magas CFU-GEMM - közepes	Alacsony
Citosztatikum-érzékenység	magas - alacsony vannak különbségek	CFU-E - magas CFU-GEMM - közepes	alacsony - közepes
Kezelést követő csökkenés	önmegújító-képességtől függ: Besug - 50 %-os csökkenés, nem dózisfüggő Citosztatikum - változó	dózisfüggő	Dózisfüggő
Regeneráció	Duplázódási idő: ~ 24 h Sejtciklus-idő: ~ 6 h	CFU-S sejtekből (plusz amplifikáció)	tranzitsejtekből
Amplifikáció stressz során	nagyon magas	CFU-E > 2^5 CFU-GEMM - magas	néha mitotikus túllövés a tranzitsejtekből
Maradandó károsodás egyszeres dózisok után	Kevés	Nagyon kevés	nincs
Maradandó károsodás ismételt dózisok után	alacsony önmegújító képesség	növekedett amplifikáció, véges	kevés a hypoplasiás fázisig

I.1.4.2. Az extramedulláris vérképzés

A lép egy limfohematopoietikus szerv, mely különböző immunreakciókat és a fehérvérsejtek érését szabályozza. Csontvelő-elégtelenség esetén, azaz nagy dózisú kemoterápiát vagy egésztest-besugárzást követően, illetve a csontvelőt érintő betegségek, például a mielodiszpláziás szindróma esetén a csontvelő nem tudja ellátni a funkcióját, a vérképzés súlyosan sérül. Ilyenkor a vérképzés beindul olyan extramedulláris helyeken is, a lépben, májban és a nyirokcsomókban, melyek már az embrionális korban is aktívan részt vettek a vérképzésben[18,116]. Ezt a folyamatot részben a csontvelőből odavándorolt, részben a léperedetű hematopoietikus őssejtek mediálják[43,115], de feltétele a megfelelő, immunsejtek és kölcsönhatások által

meghatározott mikrokörnyezet jelenléte[117]. Irodalmi adatok szerint a lépkolóniákat képző őssejtek (CFU-S) regenerációja gyorsabb, mint a csontvelői kolóniáké, így egy gyors válasz alakulhat ki hematopoietikus stresszt követően[43,118]. Az itt expandált őssejtek azután recirkulálnak a csontvelőbe, hogy ott is feltöltsék a vérképző őssejtkészletet. Az extramedulláris vérképzés így tehát egy fontos kompenzációs mechanizmus, mely által a szervezet biztosítani tudja a megfelelő oxigénellátást és immunfunkciókat még csontvelősérülés esetén is.

A lép vérképző őssejtjeire ugyanazon funkciók jellemzők, mint a csontvelői őssejtekre. Ezért tehát a lép vérképzését is befolyásolják a vérképző őssejtek funkcióit érintő jelátviteli útvonalak és egyéb mechanizmusok károsodása. Így például egyes tanulmányokban közölt adatok szerint a Fas-, az integrin-, a TACE (tumor necrosis factor alpha converting enzyme) és a STAT5-deficiens egerek extramedulláris vérképzése jelentősen megnövekedett[48,72,119-120]. Továbbá, az extramedulláris vérképzés vizsgálatával felderíthető az adott molekulának a hematopoietikus hierarchiában betöltött szerepe.

Azonban a lépben összetett immunfolyamatok is zajlanak, melyek szintén befolyásolják az őssejtek működését. Besugárzást követően ezek a szabályozó és immunfolyamatok is károsodást szenvednek, úgymint a migráció és a homing mechanizmusa. Ez magyarázhatja azt a korábbi megfigyelést, miszerint *in vivo* a lép vérképzése sokkal sugárérzékenyebbnek bizonyult, mint *in vitro* kísérletekben[115]. További magyarázat lehet még, hogy a lépben ilyenkor fokozott antigénprezentáció zajlik, ami aktív sejtosztódást jelent, ezáltal is nő a sejtek sugárérzékenysége. A lép limfocitái egyébként is igen sérülékenyek behatásokra, besugárzást követően főleg a B-sejtek száma csökken[115].

Mivel a hisztamin köztudottan részese a különböző immunfolyamatok szabályozásának, felmerül a szerepe a lép vérképzésében is. Mégpedig a dendritikus sejtekre gyakorolt hatása révén. Ugyanis az olyan egerekben, melyekből genetikailag hiányoznak a dendritikus sejtek, fokozott extramedulláris vérképzést figyeltek meg[121]. A dendritikus sejtek, az immunrendszer meghatározó antigénbemutató sejtjeiként központi szerepet töltenek be az immunválasz szabályozásában. Fő feladatuk az antigének felvétele, feldolgozása és bemutatása a T-limfocitáknak[122-123]. Ennek következtében a T-sejtek aktiválódnak, és a dendritikus sejtek által termelt citokinektől

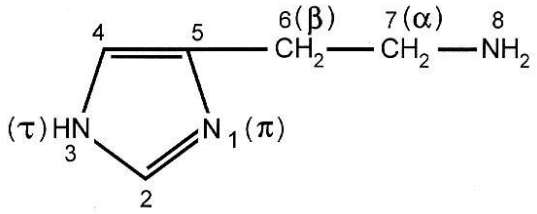
függően Th_1, Th_2, vagy akár Treg (regulátoros T-sejt) irányba polarizálódnak. Az IL-12 és IFNγ például Th_1 irányba polarizálja az aktiválódott T-sejteket, az IL-10 ugyanakkor immunszupressziót vált ki[124-125]. Ezek a jelek aztán olyan jelátviteli folyamatokat indítanak meg a T-limfocitákban, amelyek a leghatékonyabb választ eredményezik különböző immunológiai reakciókban, és így szabályozzák más sejtek funkcióit.

A dendritikus sejtek megfelelő működését, érését számos molekula befolyásolja, így a citokinek, kemokinek és egyéb szolubilis faktorok, köztük a hisztamin is[126-128]. A dendritikus sejtek legalább háromféle hisztamin receptort expresszálnak a felszínükön[129-130], sőt, egyes adatok szerint a dendritikus sejtek maguk is képesek hisztamin termelésre[127,131]. Ezért is lehet érdekes, hogy a hisztamin hogyan befolyásolja azoknak a (dendritikus és T-) sejteknek a működését, amik azután más (vérképző) sejtek sorsát határozzák meg abban a megváltozott immunológiai milliőben, amit a besugárzás okoz a lépben.

I.2 A HISZTAMIN

I.2.1. A hisztamin általános tulajdonságai, alapvető funkciói

A hisztamin egy sok funkcióval rendelkező bázikus jellegű biogén amin, az egyik legjelentősebb és az elsők között felfedezett szolubilis gyulladásos mediátor[132-136]. Főbb élettani hatásait, többek közt simaizom-stimuláló és vazodilatátor hatását elsőként Dale és Laidlaw írták le még 1910-ben[137]. A hatásokért felelős hatóanyag mindössze egy 17 atomból álló, igen egyszerű molekula, amelyet számtalan szövetből izolálni tudtak, így a „histos”, a szövet görög neve után, hisztaminnak nevezték el (4. ábra)[138].



4. ÁBRA: A hisztamin (2-(4-imidazolil)-etilamin) szerkezeti képlete.

A hisztamin szintéziséért egyetlen enzim, az L-hisztidin karboxilcsoportját eltávolító L-hisztidin-dekarboxiláz (HDC) a felelős[132-136]. A HDC expresszálódik a hízósejtekben, a bazofil granulocitákban, a központi idegrendszer hisztaminerg neuronjaiban, valamint még nagyon sokféle sejtben, így a hematopoietikus sejtekben is. A hisztamin szintéziséhez ingert jelentenek az allergiás, IgE-függő eseményeken, komplementaktivációs termékeken kívül egyéb citokinek, faktorok, hormonok valamint bakteriális termékek is[136,139-140].

Különösen nagy mértékű hisztamintermelést a hízósejtek és bazofil granulociták folytatnak. Ezek a sejtek granulumaikban preformált állapotban tárolják a termelt hisztamint, amely a granulumok akár 10 %-át is kiteheti (0.1-0.2 pmol/hízósejt)[136]. A sejtek degranulációjához (főleg az allergiás folyamatokban) az intracelluláris kalciumszint emelkedése szükséges, tehát az olyan mediátorok, melyek emelik a Ca-szintet, a tárolt hisztamin felszabadulását okozzák. Azonban e faktorok más jelátviteli utakon át is okoznak hisztaminszintézist és -felszabadulást, olyan sejtekben is, melyek nem tárolnak hisztamint granulumokban[141].

Metabolizmusában két enzim, a diamin-oxidáz (DAO), és a hisztamin-N-metil-transzferáz (HNMT) játszik szerepet. A DAO a terminális aminocsoport eltávolításával a hisztamint imidazol-acetaldehiddé alakítja[142], a HNMT a hisztamint N-metil-hisztaminná metilálja[143]. A metabolitok a vizelettel ürülnek ki. Eltérés van a két enzim szöveti eloszlásában: míg a DAO csak néhány szövettípusban expresszálódik, pl. a vékonybélben, a vesében és a placentában[144], addig a HNMT széles körű szöveti elterjedést mutat[143,145].

A hisztamin alapvető szerepet tölt be a szervezet fiziológiás és patológiás folyamataiban azáltal, hogy központi immunológiai reakciókat és sejteket befolyásol[136,146]. Számos kórkép kialakulását hozták összefüggésbe vele, így az allergiás és egyéb gyulladásos folyamatokon[147] túl az atheroszklerózis[132,148], egyes daganatok[149] és autoimmun betegségek[150] szabályozásában is részt vesz. Továbbá, mivel a hisztamin megtalálható szinte minden sejtben, így feltételezhető, hogy intra- és intercelluláris mediátorként akár alapvető sejtélettani folyamatok szabályozásában is szerepet vállal[136].

I.2.2. A hisztaminreceptorok

A hisztamin élettani hatásait specifikus receptorain keresztül fejti ki, melyeket a felfedezésük sorrendjében hisztamin H1, H2, H3 és H4 receptornak neveztek el (rövidítve H1R, H2R, H3R, H4R). Mind a négy receptor a G-proteinhez kapcsolt receptorcsaládhoz tartozik, és hét transzmembrán doménnel rendelkezik. Szöveti eloszlásuk, ligandkötő affinitásuk, jelátviteli útjaik és funkcionális sajátosságaik jelentős mértékben különböznek egymástól[151,153]. A 3. táblázat foglalja össze a különböző receptorokon kiváltott hatásokat.

3. TÁBLÁZAT: Hisztaminreceptorok és az általuk közvetített hatások.
(Forrás: [151-153] alapján összeállítva)

Receptor	H1R	H2R	H3R	H4R
Jelátvitel	Gq→ PLC-PKC↑	Gs→ cAMP↑	Gi/o→ cAMP↓, ic.Ca↑, MAPK↑	Gi/o→ cAMP↓, ic.Ca↑, MAPK↑
Szöveti eloszlás	Szinte minden sejt: -légút- és ér simaizom, -endotélsejtek, -idegsejtek, -kondrociták, -hepatociták, -T- és B-limfociták, -dendritikus sejtek, -monociták, -granulociták, -vérképző sejtek	Szinte minden sejt: -légút- és ér simaizom, -endotélsejtek, -idegsejtek, -kondrociták, -hepatociták, -T- és B-limfociták, -dendritikus sejtek, -monociták, -granulociták, -vérképző sejtek	-Központi idegrendszer: hisztaminerg neuronok, -alacsony expresszió a perifériás szövetekben	-Hízósejtek, -bazofil és -eozinofil granulociták, -dendritikus sejtek, -T-limfociták, -vérképző sejtek
Hatások	•vazodilatáció •posztkapilláris permeabilitás↑, plazma-extravazáció •simaizomkontrakció •viszketés •nyáktermelés •leukocita-kemokinézis •prosztaglandin-termelés tüdőben •pulmonáris vazokonstrikció	•gyomorsav-termelés •nyáktermelés •leukocita-kemokinézis •T-limfociták aktivációja •vazodilatáció •+ino/kronotrop hatás a szívre	•hisztamin- és neurotranszmitter-felszabadulás gátlása •hisztaminszintézis gátlása	•kemotaxis •vérképzés? •egyéb immun-folyamatok
Szelektív antagonista	Astemizol, Mepiramin, Cetirizin, Chlorpheniramin, Clemastin, Loratidin, Terfenadin, Tripolidin	Cimetidin, Famotidin, Ranitidin, Tiotidin, Zolantidin	Carboperamid, Clobenpropit, Iodoproxyfan, Thioperamid	JNJ7777120, JNJ10191584, Thioperamid

Hisztamin H1 receptor (H1R)

A H1R jelátvitele elsősorban $G_{q/11}$ proteineken keresztül, tehát a foszfolipáz-C által aktivált útvonalakon, többek között a protein-kináz C közreműködésével zajlik[151,153-154]. A szöveti eloszlását tekintve elmondhatjuk, hogy ez a receptor igen nagy elterjedtséget mutat, hiszen nagymértékű H1R expresszió mutatható ki többek között az endotél sejteken, a sima- és szívizomsejteken, a központi idegrendszer számos neuronján, valamint a mellékvesevelő kromaffin sejtjein[154-155]. Az immunrendszer sejtjei közül a granulociták, a monociták, a dendritikus sejtek, a T- és B-limfociták, továbbá a vérképző prekurzorok is hordozzák [156].

A H1R aktiválódása számos jellegzetes hisztaminhatás kialakulásához vezet. Ez a fő hisztaminreceptor az allergiás válasz során, mivel mind a hörgők és tápcsatorna simaizomzatának összehúzódásában, az endotél aktivációjában, az érfal-permeabilitás növekedésében, a nyákszekrécióban, mind pedig az allergiás válasz során jellemző, kiterjedt vazodilatációban is központi szerepe van[153,155]. Az azonnali típusú hiperszenzitivitás tünetei H1R antagonistákkal jól kezelhetők, tehát a H1R-nak nagy klinikai jelentősége is van. A hisztamin a H1R-on keresztül hatással van más immunológiai folyamatokra is, pl a Th_1-jellegű, azaz a celluláris immunválaszt támogató immunrendszeri kommunikációt erősíti[157].

A hisztamin a H1R-on keresztül a központi idegrendszer működését is befolyásolja: egyebek mellett szabályozza a cirkadián ritmust és az étvágyat[158-159].

A hisztamin a vérképzésre is hatást gyakorol a H1R által, ugyanis ezen a receptoron keresztül vesz részt a hematopoietikus progenitorok osztódásának szabályozásában[157].

Hisztamin H2 receptor (H2R)

A H2R esetében a hisztamin hatását főként G_s fehérjék közvetítik, tehát elsősorban ciklikus adenozin monofoszfát (cAMP) keletkezését katalizáló útvonalak aktiválódnak[136,160]. A H2R hasonlóan széles körű szöveti eloszlást mutat, mint a H1R. Expresszióját igazolták az erek simaizom-sejtjein, a szívizomsejteken, ahol a H1R-ral ellentétes hatásokat közvetít[161], továbbá a központi idegrendszer sejtjein, a zsírsejteken, valamint a vérképzés sejtjein is[136,153]. Klinikai szempontból kiemelkedő a H2R alapvető

szerepe a gyomornyálkahártya sósav-szekréciójának szabályozásában[162]. A hisztamin H2R-hoz kötődése a K^+-H^+ pumpákat stimulálja a gyomorban, ami megnövekedett gyomorsav-szekrécióhoz vezet. A savas pH megfelelő környezet biztosít a gyomorban történő emésztési folyamatokhoz, valamint alapvető védekezési mechanizmust jelent a tápcsatornába jutó kórokozókkal szemben. Ebből az alapvető funkciójából adódik a H2R-antagonisták széles körű alkalmazása a gyomornyálkahártya védelmében egyes fokozott savszekréciós állapotokban.

Az immunrendszerben a H2R főként Th_2-jellegű, szuppresszív, illetve részben a humorális válaszokat is támogató immunmodulatórikus jeleket közvetít[129,157]. A vérképző sejteken a hisztamin a H2R-on keresztül inkább a differenciálódást elősegítő folyamatokat indítja be[157].

A H2R expresszió több olyan sejten is kimutatható, amelyen jelen van a H1R, pl. az immunsejteken. Az ilyen esetekben a hisztamin az eltérő receptorokon keresztül gyakran ellentétes hatásokat vált ki. Ez azt is jelenti, hogy a hisztamin által kiváltott végső hatás függ a receptorok megjelenési arányától és kötési affinitásuktól[157].

Hisztamin H3 receptor (H3R)

A H3R a hisztamin hatását főként $G_{i/o}$ fehérjéken keresztül közvetíti, amelyek gátolják a cAMP keletkezését, serkentik az intracelluláris Ca^{++} felhalmozódást és aktiválják a MAPK útvonalat[163]. A H3R expressziója az előző két receptorral ellentétben elsősorban a központi idegrendszeri neuronokra korlátozódik, de egyes perifériás idegsejteken is kimutatták jelenlétét[164-165]. A H3R preszinaptikus receptorként modulálja a hisztamin és más neurotranszmitterek kibocsátását, valamint autokrin módon, negatív visszacsatolás útján szabályozza a neuronok hisztamintermelését[166]. A hisztamin H3R-on keresztül kifejtett hatása az étvágy, a figyelem, a memória, a cirkadián ritmus és az alvás szabályozásában játszik fontos szerepet[167].

Hisztamin H4 receptor (H4R)

A hisztamin negyedik receptorát csak nemrégiben, 2001-ben fedezték fel[168]. A H4R jelátvitele elsősorban $G_{i/o}$ proteinek aktiválásán keresztül zajlik. Stimulációja olyan jelátviteli útvonalakat indít be, amelyek a foszfolipáz C aktiválódásán keresztül Ca^{++} beáramláshoz, a cAMP-szint csökkenéshez és a MAPK útvonal aktiválódásához

vezetnek[136,153]. Ahogyan a jelátviteli mechanizmusait sem írták még le teljes részletességgel, úgy a pontos biológiai funkcióit illetően is egyelőre kiterjedt kutatások zajlanak. Jellegzetes szöveti eloszlást mutat, ugyanis szinte kizárólag az immunrendszer szöveteiben, a csontvelőben, a tímuszban, a lépben és a nyirokcsomókban mutattak ki nagymértékű H4R expressziót. A H4R immunkompetens sejtek felszínén jelenik meg, így elsősorban a bazofil és eozinofil granulocitákon, a hízósejteken, egyes T-limfocitákon, a dendritikus sejteken, valamint a hematopoietikus sejteken[136,152,169-170].

Az a tény, hogy a H4R kizárólag az immunrendszer sejtjein expresszálódik, felhívja a figyelemet arra, hogy a hisztamin ezen a receptoron keresztül valószínüleg nagy mértékben befolyásolja a gyulladásos és egyéb immunfolyamatokat[151,169,171]. A hisztamin a H4R-on keresztül serkenti az eozinofil granulociták és a hízósejtek kemotaxisát azáltal, hogy aktinpolimerizációt indukál és Ca^{++}-ot szabadít fel[151,170-171]. H4R-antagonista kezelés hatására, illetve a H4R genetikai hiányában (H4R génkiütött egerekben) mérséklődnek a gyulladásos és allergiás tünetek, és a tüdőt infiltráló eozinofilek és limfociták száma is lecsökken. Ezzel együtt csökken a T-sejtek IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 és IL-17 citokintermelése, ezáltal gyengülnek a Th_2 irányú válaszok[170,172]. Mindezen adatok felvetik annak a reményét, hogy a H4R-antagonisták hatékonyak lehetnek az allergiás megbetegedések, például az asztma kezelésén túlmenően egyéb gyulladásos és autoimmun betegségekben is (pl. colitis ulcerosában)[173-174].

Mivel a H4R a vérképző sejteken is nagy számban megtalálható, felvetődik a lehetősége annak, hogy a hisztamin a vérképzést esetleg ezen a receptorán keresztül is szabályozza[136]. Dolgozatunknak egyik fő célja volt ennek a kérdésnek a vizsgálata.

I.3. A HISZTAMIN SZEREPE A CSONTVELŐBEN

I.3.1. A hisztamin hatása az őssejtekre

Évtizedek óta ismert, hogy a klasszikus hisztaminraktározó sejteken kívül gyakorlatilag valamennyi hematopoietikus sejt képes a hisztamin termelésére. Mégis, még mindig sok az ellentmondás a hisztaminnak a vérképző ős- és progenitorsejtek élettanában betöltött szerepét illetően. Egyre több a kísérleti bizonyíték, miszerint a hisztamin a gyulladásos és allergiás folyamatok szabályozásán túl befolyásolja a csontvelő sejtjeinek funkcióit, osztódásukat és differenciálódásukat serkenti.

A HDC enzim expresszióját sokféle, érett és éretlen hematopoietikus sejttípusban mutatták már ki, úgymint perifériás fehérvérsejtekben[175], dendritikus sejtekben[131,176], különböző sejtvonalak irányában elkötelezett progenitorsejtekben[141], például a makrofág és a bazofil sejtvonal sejtjeiben[177-178], valamint a csontvelő korai vérképző progenitor- és őssejtjeiben is[179-182]. Az *ex vivo* izolált normális sejteken kívül a HDC-t kimutatták különböző IL-3-dependens sejtvonalak (például a Jurkat T-sejtvonal) sejtjeiben[141,156,177], valamint akut limfoid leukémiás betegekből izolált limfocita-prekurzorokban is[183]. A HDC enzim kimutatása ezekben a sejtekben egyben megnövekedett hisztamintermelést is jelent bennük.

Mivel tehát ennyiféle vérképzősejtben található meg a hisztamin szintéziséért felelős enzim, óhatatlanul is felmerül a gondolat, miszerint a hisztaminnak valamiféle alapvető szabályozó szerepe lehet ezen sejtek funkcióiban[132]. Ezt a hipotézist elsőként Byron vetette fel 1977-ben, aki megfigyelte, hogy a külsőleg adott hisztamin a pluripotens őssejteket a sejtciklusba lépésre, ezáltal osztódásra készteti[184]. Ezt követően számos adat gyűlt fel a szakirodalomban a hisztaminnak a vérképzésben betöltött feltételezett szerepét illetően. Kiemelkedők a francia Dy és munkacsoportja által végzett kiterjedt kutatások eredményei[136]. Megállapították, hogy a hematopoietikus sejtek képesek mind a hisztamin szintézisére, mind felvételére[180]. Különböző behatásokra (citokinekre, kémiai és antigénstimulusokra) ezek a sejtek dózisfüggő mértékű hisztamintermeléssel válaszolnak[141,177,182,140,185].

A hisztamin minden bizonnyal befolyásolja a vérképző sejtek osztódását. *In vitro* kísérletekben a HDC vagy a hisztaminreceptorok gátlásával mind egér csontvelői, mind pedig emberi perifériás progenitor sejtek kolóniaképzését gátolni lehet[186-187]. A hisztamint immunválasz során a T sejtek osztódásában is moduláló faktorként mutatták ki[188]. Továbbá, leukémiás betegekből izolált sejtek magas intracelluláris hisztamin-tartalma felveti a hisztamin szerepét a leukémiás sejtek proliferációjában is mint autokrin regulátor[183].

A hisztamin befolyásolja a hematopoietikus differenciálódási folyamatokat is. Indukálja a mieloblasztok mielocitákká történő érését H2 receptorokon keresztül[189]. Továbbá, a monociták makrofágokká vagy dendritikus sejtekké való differenciálódása közben megnő az intracelluláris HDC és hisztamin szintje[176,190-191]. Végezetül pedig

megfigyelték, hogy genetikailag hisztaminhiányos egerekben a csontvelői eredetű hízósejt differenciálódás mértéke jelentősen lecsökkent[192].

Ezekkel az eredményekkel párhuzamosan egyre nő azoknak az irodalmi adatoknak a száma, melyek microarray adatokat közölnek a HDC expressziójáról bizonyos vérképző funkciók vetületében. Így például a HDC enzim upregulálódik a granulocita-makrofág vonal iránti elköteleződés során[81,193]. Továbbá, G-CSF-mobilizáció és érés hatására a CD34+ sejtek jelentős HDC expresszió növekedést mutatnak[35,194].

A hisztamin sejtosztódásra gyakorolt hatása miatt befolyásolja a szöveti regenerációs folyamatokat is. Kahlson már 1968-ban megállapította, hogy a sérült szövetek regenerációja megnövekedett hisztamintermeléssel jár együtt[195]. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy genetikailag módosított, hisztaminhiányos egerek korai sebgyógyulása 25%-kal elmarad a vad típusú egerekétől[196].

Mindezen szabályozó funkciókban nagy valószínűséggel részt vállalnak a hisztamin receptorai is. Ahogy azt az előző szekcióban említettük, a hisztaminnak három receptorát, a H1R-t, a H2R-t és a H4R-t expresszálják a vérképző sejtek[153]. A receptorok expressziós mintázata összefüggésben lehet a hisztaminnak az adott sejten kifejtett eltérő hatásával. Míg a hisztamin a H1R-en keresztül a progenitorok osztódását, addig a H2R-en keresztül a differenciálódásukat segíti elő[157,147]. Ennek a hátterében a receptorok jelátviteli mechanizmusa által aktivált gének hatása állhat. A H1R a c-fos aktivációjával a hisztamin további termelődését és osztódási folyamatok serkentését idézi elő[197]. A H2R ezzel szemben a cAMP-protein kináz A útvonal által az intracelluláris kalcium anyagcserébe avatkozik bele, ami inkább gátló mechanizmusokat indít el, és sejtdifferenciálódást indukál[179]. Ezt alátámasztja az a megfigyelés, miszerint a hisztamin a CFU-S, a CFU-GM és a CFU-Meg kolóniák érését fokozza a H2-receptoron keresztül, ugyanakkor a H1-agonista tiazoletilaminnak nincs hatása[191,198]. Érdekes adat, hogy a hisztamin a H2R-on keresztül gátolja az LPS-indukált TNFα felszabadulást a makrofágokban, de a monocitákban nem. Ennek hátterében valószínűleg a monociták makrofággá történő differenciálódása során bekövetkező H1-H2 receptorváltás és génszuppresszió állhat. Így lehet szerepe a hisztaminnak a monocita-makrofág differenciálódás szabályozásában[191].

Mindezen eredmények alátámasztják a hisztamin kardinális szerepét a vérképző sejtek élettani funkcióiban. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy összességében ezeknek a tanulmányoknak mégsem sikerült igazolni, hogy a hisztamin vagy annak hiánya alapvetően és globálisan befolyásolná az *in vivo* nyugalmi vérképzést[136].

I.3.2. A hisztamin és a hematopoietikus citokinek

Az előző fejezetekből nyilvánvalóvá vált, hogy a vérképző ős- és progenitorsejtek funkcióit sokféle és bonyolult hatások összessége határozza meg. Ennek a komplex citokinhálózatnak lehet részese a hisztamin is. Sok hematopoietikus citokin hat a hisztamintermelésre, miközben kifejtik hatásukat a csontvelői sejteken. Ugyanakkor a hisztamin is hat a többi mediátor szekréciójára, így az még nem tisztázott pontosan, hogy csak közvetítő, moduláló funkciója van-e, vagy esetleg maga is egy önálló hematopoietikus faktor.

A leginkább kutatott összefüggés a hisztamin és az IL-3, mint az egyik legfőbb korai hematopoietin kapcsolata. Dy és munkatársai által végzett tanulmányok bizonyították, hogy *in vitro* IL-3 illetve GM-CSF hatására a csontvelői sejtek hisztamintartalma dózisfüggő módon megnő[139-141,182]. Ennek hátterében a hisztamin *de novo* szintézise áll, ugyanis hisztidinmentes tenyésztés mellett, vagy a-fluorometil-hisztidin (FMH), a HDC-enzim irreverzibilis gátlójának hozzáadásával teljesen megszűnik ez a jelenség. Az IL-3 és a GM-CSF hatására a sejtek HDC-tartalma is megnő a megnövekedett enzimátírás következtében[139]. Ezt főként a CFU-S, a CFU-GM és a hízósejt-prekurzor populációkban észlelték. A két faktor hatásmódja eltér, a GM-CSF-re a HDC-aktiváció gyorsabban kezdődik, IL-3-ra viszont mindig magasabb hisztaminszinteket mértek[140].

Ha a csontvelői progenitorsejteket Ca-ionofórral kezeljük, ami a kalcium-beáramlást növeli, a hisztaminszintézis megnő bennük, a HDC-enzim mRNS-ének mennyiségének mérhető növekedésével párhuzamosan. Tehát a kalcium nemcsak a preformált hisztamint tartalmazó granulumok kiürítéséhez szükséges, hanem magának a szintetizáló enzim fokozott termelődéséhez is[141]. Az IL-3 egyik hatása is az intracelluláris kalcium emelésén keresztül zajlik, és így okozhatja a hisztaminszintézis növekedését a sejtekben[140].

Mindez magyarázza azt a megfigyelést is, miszerint betegek hosszas IL-3 kezelése során gyakrabban lép fel allergiás reakció. Ezekből a betegekből nagy mennyiségben lehetett kimutatni hisztamintermelő sejteket, melyek felszínükön expresszálják az IL-3 receptorait[199]. Kimutatták továbbá, hogy a szervezet egészét érintő immunológiai folyamatokban is IL-3-mediált endogén hisztamin termelődik a csontvelői őssejtek mikrokörnyezetében[200], így a hisztamin hozzájárul a csontvelő alkalmazkodásához az immunválasz során. Ezen eredmények arra is utalnak, hogy az IL-3 direkt őssejthatásán kívül indirekt módon, másodlagos mediátorok, mint pl. a hisztamin érettebb sejtekből való felszabadítása révén is befolyásolja a vérképzést.

Az egyik feltételezett mechanizmus, amellyel az IL-3 a hisztaminnak a sejteken kifejtett hatását elősegítheti, az a hisztamin receptorainak, főleg a H1R-nek az upregulációja[157]. Mivel a hisztamin a különböző receptorain keresztül eltérő hatást közvetít, ezért érdemes lehet tanulmányozni e hatásmechanizmusok viszonyát az IL-3 jelátvitellel.

Mindezen megfigyelések alapján, mivel a hisztaminnak és az IL-3-nak hasonlóképpen a vérképző őssejtek a célpontjaik, ezért a köztük lévő kétirányú kapcsolat felderítése különösen jelentős részét képezi a hisztamin hematopoiezisben betöltött szerepének vizsgálatában.

Meg kell továbbá említeni, hogy egyéb citokinek irányában is folynak kutatások[201]. A G-CSF és a GM-CSF önmagukban is képesek a sejtekben hisztamintermelést és hisztaminreceptor expressziót indukálni[202-203]. A kölcsönhatás fordított irányban is működik, ugyanis a hisztamin elősegíti a G-CSF receptor externalizációját, valamint a GM-CSF termelődését mind transzkripciós, mind poszttranszkripciós szinten, főleg a H1R jelátvitelén, a PKC-n és az ERK aktiválásán keresztül[197,204]. További kísérletek megállapították, hogy az IL-1 és a GM-CSF együttesen hisztaminszintézist okoz CFU-S sejtekben, a sejtciklusba lépésüket és osztódásukat segítve elő[205], a TPO indukálja a HDC gén expresszióját[206], valamint az IL-18 és IL-12 stimulálja a hisztamin és az IL-4 szintézisét bazofil granulocitákban[207-208]. Másrészt a hisztamin is befolyásolja a citokinek termelődését és hatásait. Növeli az IL-6 szintézisét melanómasejtekben[209], és gátolja a szabad oxigéngyökök termelését a makrofágokban, ami meggátolja más citokinek (IL-2, IFNγ) hatását a NK-aktivációban[210]. Ezért újabb tanulmányokban

hisztaminnal próbálják kiegészíteni ki a melanómás és akut mieloid leukémiás betegek citokinterápiáját[211-213].

Végezetül, mint a csontvelőt érintő bármely aspektusban, itt is felmerül a hisztamin szerepe a csontvelői stróma által mediált folyamatokban. A már említett makrofágokon és trombocitákon kívül ugyanis befolyásolja az endotél működését is: adhéziós molekulák szintézisét, P-szelektin-, prosztaglandin- (PGI2-), trombocita-aggregáló faktor (PAF-), leukotrién- (LTB4-), és IL-8-szekréciót indukál, ezzel is hozzájárul a vérképzés támogatásához[214].

I.3.3. A hisztamin és a besugárzás

Ahogyan azt már korábban kifejtettük, besugárzást követően többféle folyamat zajlik egyszerre a csontvelőben: szöveti gyulladás és strómakárosodás, a citokinprofil megváltozása, nekrózis és apoptózis, valamint a hematopoietikus sejtek mitotikus leállása, majd regenerációja. Mindegyikük külön-külön is bonyolult, kifinomult folyamatok összehangolt rendszerét igényli. És mindegyikben szerepe van a hisztaminnak, mintegy összekötő kapocsként mediálva az egyes folyamatokat.

Már évtizedekkel ezelőtt felmerült a hisztamin-hipotézis a besugárzás után mért magas szérum és szöveti hisztaminszintek alapján, mely a hisztamin központi szerepét feltételezi az ionizáló sugárzást követő folyamatokban[2,215]. A besugárzást követő korai időszakban a hízósejtek degranulációja nagy mennyiségű hisztamin kiáramlást eredményez a szövetekben testszerte, így a csontvelőben is. Mindez a besugárzásra adott szisztémás gyulladásos reakció részjelensége.

Mivel ezek a változások érintik a strómasejteket is, és meghatározóak a csontvelőkárosodás késői kimenetelét illetően, ezért is irányultak a kutatások korábban olyan anyagok alkalmazása felé, melyek a hisztaminfelszabadulás gátlásával, illetve gyökfogó képességük révén megakadályozhatják ezt a korai gyulladásos reakciót a csontvelőben, és így kivédhetik a sugárzás korai és késői károsító hatásait. Számos kísérleti eredmény igazolja a különböző hisztaminreceptor-blokkolók (főleg a H2R-antagonisták) sikeres alkalmazását akut sugárkárosodásban, akár közvetlenül besugárzást követően, akár preventíven, még a behatást megelőzően adva[215]. Sajnos

azonban nincsen adat ezekben a tanulmányokban arról, hogy ezek a kezelések hogyan befolyásolták az őssejtek regenerációját.

Ami a sugárzás-indukált direkt celluláris károsodásokat illeti, egyre több kísérleti adat gyűlik össze a hisztamin védő szerepére vonatkozóan. Medina és munkatársai több publikációjukban igazolták, hogy a hisztamin szelektíven véd a besugárzás sejtszintű károsító hatásaival szemben, például a vékonybél őssejtjeiben[216-217]. Továbbá, a hisztamin gátolni képes az apoptózist több érett sejttípusban, például hízósejtekben[218] és granulocitákban[97], de éretlen sejtekben is, így léperedetű prekurzorokban, amelyekben Fas-keresztkötés hatására csökken az IL-3 stimulációra adott hisztaminfelszabadulás mértéke[219]. Hasonló eredményeket írtak le egyes tumorsejtvonalakban is, ahol a hisztamin megnövekedett expressziója antiapoptotikus hatásúnak bizonyul. Így például leukémiás prekurzor sejtekben az állandó sejtosztódást fenntartó autokrin regulátorként funkcionál[183]. Továbbá Jurkat sejtek H1R-antagonista kezelése a sejtek növekedési gátlását, illetve az apoptózisuk fokozódását okozza[156,220].

A besugárzást követő károsodásokkal párhuzamosan azonban beindulnak a regenerációs folyamatok is, amelyben a hisztaminnak szintén vélhetően jelentős szerepe van. Az előző szekcióban bemutatott kísérleti adatok alapján feltételezhető, hogy a hisztamin pozitívan befolyásolja a regenerálódó vérképző őssejtek ciklusba lépését, osztódását és differenciálódását, így elősegíti a csontvelőműködés helyreállítását.

I.4. KÉRDÉSFELTEVÉS: A HISZTAMIN HATÁSA A VÉRKÉPZŐ ŐS- ÉS PROGENITORSEJTEK MŰKÖDÉSÉRE

Az utóbbi évtizedekben egyre több bizonyíték gyűlt össze arról, hogy a hisztamin az őssejtek osztódását és differenciálódását hogyan befolyásolja. A bevezetésben részletesen kifejtettük, hogy a HDC-t és a hisztamint nagy mennyiségben mutatták ki a különböző csontvelői sejtpopulációkban, és ezt összefüggésbe lehetett hozni a sejtek működésével. Mégis, még mindig tele van ellentmondással a tudományos társadalom a hisztaminnak a hematopoietikus kompartmentben betöltött pontos szerepét illetően.

Jelen tanulmányunkban ezt a kérdéskört próbáltuk tisztázni. A dolgozat középpontjában a vérképző ős- és progenitorsejtek, és azok funkcióinak vizsgálata áll.

Elsősorban azt a kérdést kívántuk vizsgálni, hogy a hisztamin, mint közismert gyulladásos, illetve allergiás mediátor, hatással van-e ezen sejtek működésére, és ha igen, milyen szerepet tölt be abban. Továbbá kíváncsiak voltunk arra is, hogy a hisztamin milyen regulációs szinteken befolyásolja a vérképzést a csontvelőben és a lépben egyaránt.

Az ellentmondások részben abból fakadhatnak, hogy a bemutatott eredmények többnyire *in vitro* kísérletekből származnak, amelyek céljuknak megfelelően csak bizonyos hatásokra koncentrálnak, azonban a lényegüknél fogva kizárják a komplex összhatások vizsgálatát. Ezért a kérdések megválaszolásához és a hisztamin hatásainak elemzéséhez olyan egérmodellt használtunk, amely nem rendelkezik a hisztamin előállítására képes HDC enzim génjével. Ezek az úgynevezett HDC knockout ($HDC^{-/-}$) egerek tehát képtelenek maguknak hisztamint termelni, és amennyiben két hétig speciális, hisztaminmentes táplálékkal megvonjuk a külső hisztaminbevitelt is tőlük, ezek az állatok teljességgel hisztaminmentessé tehetők[134]. Ezáltal a hisztamin hatásai egy tiszta, *in vivo* rendszerben vizsgálhatók. A fenti eredmények ismeretében feltételeztük, hogy a hisztamin hiányában a vérképző sejtek funkciói (proliferáció, differenciálódás) bizonyos mértékben, de alapvetően károsodnak. Kísérleteinkben természetesen az *in vivo* modellt kiegészítettük *in vitro* rendszerekkel is.

Vizsgálataink első lépcsőjében összehasonlítottuk a vad genotípusú és a hisztaminhiányos egerek vérképzését nyugalomban illetve hematopoietikus stresszhatást (egésztest-besugárzást) követően. Vizsgálataink kiterjedtek a hisztamin, a HDC, valamint a hisztamin receptorainak analízisére a különböző csontvelői sejtekben, és eredményeinket összevetettük a sejtek funkcionális sajátosságaival. Az eltérések hátterében feltételeztük a hisztamin moduláló hatását az IL-3 jelátvitelére, ezért többszinten elemeztük ezt az aspektust. Tanulmányunk második lépcsőjében az extramedulláris vérképzést hasonlítottuk össze a hisztamin jelenlétében illetve hiányában, annak érdekében, hogy a hisztaminnak a hematopoietikus hierarchiában betöltött specifikus funkcióiról nyerjünk információt. Végezetül megvizsgáltuk a hisztamin szerepét a csontvelői őssejtek apoptózisában.

II. Célkitűzések

1. **A nyugalmi és stressz-indukált csontvelői vérképzés összehasonlítása genetikailag módosított, hisztaminhiányos és vad genotípusú egerekben:**
   - A csontvelő és a perifériás vér nyugalmi sejtösszetételének összehasonlítása
   - A csontvelői kolóniaformáló (CFU) őssejtek összehasonlítása
   - Az egésztest-besugárzást követő csontvelő-regeneráció, és az őssejt-populációk arányának összehasonlító vizsgálata *in vivo* kísérleti rendszerben
   - Az őssejtek proliferációs készségének összehasonlítása *in vitro* rendszerekben
2. **A különböző őssejt-populációk HDC és hisztamintartalmának meghatározása a csontvelő-regeneráció során. A hisztamin (H1, H2 és H4) receptorok szerepének vizsgálata a vérképzésben.**
3. **Az IL-3 jelátvitel összehasonlítása $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek csontvelősejtjeiben:**
   - Az IL-3 receptorok expressziójának elemzése *in vivo*, a regeneráció során
   - Az IL3R expresszió vizsgálata *in vitro*, a hisztamin termelődésének illetve hatásának gátlása mellett
   - Az IL-3 főbb jelátviteli molekuláinak (STAT5, MAPK) *in vivo* és *in vitro* expressziós vizsgálata, és a STAT5 foszforiláció összehasonlítása
4. **Az extramedulláris vérképzés összehasonlítása $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerekben:**
   - A lép sejtösszetételének meghatározása
   - A lép kolóniaformáló (CFU) őssejtjeinek vizsgálata
   - A lép őssejt-populációinak összehasonlítása egésztest-besugárzást követő, spontán regeneráció során
   - Az IL-3 jelátvitelének elemzése a lépsejtekben
5. **A hisztaminhiányos és a vad típusú egerekből származó csontvelősejtek apoptóziskészségének összehasonlítása:**
   - Az apoptózis vizsgálata *in vivo,* egésztest-besugárzást követően
   - A sejtpusztulás vizsgálata *in vitro* besugárzás hatására
   - Az apoptózis elemzése *in vitro* etopozid-indukcióra
   - A sejtpusztulás vizsgálata *in vitro*, a hisztamin termelődésének illetve hatásának gátlása mellett

III. Anyagok és módszerek

III.1. KÍSÉRLETI ÁLLATOK

Kísérleteinkhez egy genetikailag hisztaminhiányos egérmodellt használtunk, amelyből hiányzik a hisztamin előállításáért felelős enzim, a hisztidin-dekarboxiláz (HDC) génje. Mivel ez az egyetlen enzim, amely hisztidinből hisztamint képes előállítani, ennek a génnek a kiütésével az állat többé nem képes hisztamin termelésre. A HDC-génkiütött (knockout, KO, $HDC^{-/-}$) egértörzset Ohtsu és társai homológ rekombinációval hozták létre intézetünkkel és egy kanadai laboratóriummal együttműködve[134]. Az így nyert egérmodellt beltenyésztett, BALB/c egértörzsre kereszteztük vissza. Az egereket intézetünk akkreditált állatházában, specifikus kórokozómentes (SPF) körülmények között szaporítottuk. Minden kísérlethez 6-10 hetes nőstény egereket használtunk fel. Annak érdekében, hogy az állatok a táplálék útján se juthassanak hisztaminhoz, már a kísérleteket megelőző két hétben speciális hisztaminmentes tápon (Altromin Gmbh, Németország) tartottuk őket, miközben a vízfogyasztásukat nem korlátoztuk. Így, mindezek eredményeként teljes hisztamin hiányt értünk el az egerekben.

A kísérletekhez a génkiütött egerek mellett BALB/c hátterű vad (wild type, WT, $HDC^{+/+}$) genotípusú egyedeket alkalmaztunk kontrollként.

III.2. BESUGÁRZÁS-INDUKÁLT CSONTVELŐ-REGENERÁCIÓS MODELL – *IN VIVO*

A kutatásainkban feltett kérdésekre a vizsgálatokat két kísérleti modellrendszerben végeztük. Az első rendszerben kihasználtuk azt a szerencsés helyzetet, hogy a $HDC^{-/-}$ egérmodell természetéből adódóan hisztaminmentes állat, így bármilyen, az egerekre gyakorolt behatás nyomán tapasztalt eltérés a hisztamin hiányának tulajdonítható. Így a hisztamin *in vivo* hatását tudjuk vizsgálni.

Mivel az – egyébként nehezen vizsgálható - őssejtek proliferációs képességét legjobban a csontvelő regenerációja alatt tudjuk elemezni, ezért mind a vad genotípusú, mind a hisztaminhiányos egerek szubletális, egyszeri 4 Gy összdózisú teljestest-besugárzásban részesültek. A dózist empirikusan határoztuk meg, az irodalomban közölt ilyen egértörzsön végzett korábbi tapasztalatok alapján[3,221-223]. A gamma-

besugárzást az Országos „Frédéric Joliot-Curie” Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézetben (OSSKI) végeztük egy Co60 γ sugárforrással működő Siemens Gammatron-3 besugárzó készülékkel, 0,2145 Gy/perces dózisteljesímény mellett.

A mintákat a besugárzást követő 6. órában, valamint az 1., 3., 7. és 14. napon vettük le, a kísérletektől függően. Az ugyanabból az alomból származó, de besugárzásban nem részesült állatok képezték a kontroll (0. napi) csoportot. Az *in vivo* kísérletekhez csoportonként 5-6 db állatot használtunk.

III.2.1. Csontvelői, léperedetű és perifériás vérsejtek izolálása

Az egerek éteres túlaltatását követően testsúlyukat megmértük. A vena cava inferiort megpungálva kivéreztettük őket, majd kivettük a lépet és kipreparáltuk az állatok comb- és felkarcsontjait.

A csontvelő-szeparáláshoz az átmosásos („flushing”) módszert alkalmaztuk. Összesen 2 ml 1%-os BSA-t (bovine serum albumin, marha szérum albumin) tartalmazó PBS (phosphate buffered saline) oldattal, steril 20G tűt használva a csontokat nagy erővel átfújtuk. Az így nyert sejtszuszpenziót egy 30 μm-es steril Filcon szűrőn (BD Biosciences, San Jose, CA) átszűrtük, majd lecentrifugáltuk (300 g, 5 perc). Az üledéket reszuszpendáltuk 1 ml PBS-sel.

A lépminták feldolgozásához először analitikai mérleggel megmértük a lépek súlyát. A lépsejteket mechanikus szétdörzsöléssel izoláltuk, majd PBS-ben vettük fel. A sejtszuszpenziót a csontvelővel azonos módon leszűrtük és megmostuk.

A perifériás vérből, a csontvelő- és a lépszuszpenziókból Medicor Laborscale sejtanalizátorral (Medicor Elektronika Zrt., Budapest) megmértük a fehérvérsejt-, vörösvérsejt- és az összsejtszámokat.

A csontvelői és lépmintákat azután megfestettük fluorokrómmal jelölt monoklonális antitestekkel a hematopoietikus sejttípusok jellemzéséhez, sejtfelszíni és intracelluláris molekulák expressziós vizsgálatához, vagy mRNS kivonása céljából további feldolgozásra kerültek (lásd alább).

III.3. *IN VITRO* RENDSZEREK

Az *in vivo* rendszerekben komplex kölcsönhatások érvényesülhetnek, melyek maguk is befolyásolhatják vagy okozhatják az észlelt eltéréseket. Ahhoz, hogy vizsgálatainkban kizárjuk a szisztémás regulációt, és bizonyítsuk a hisztamin endogén, sejtszintű hatásait, *in vitro* rendszereket állítottunk fel.

A sejttenyésztéses kísérleteinkhez $HDC^{-/-}$, és vad típusú, kezeletlen egerek csontvelői és lépsejtjeit használtuk. A sejtszeparálás hasonlóan történt, mint ahogy korábban leírtuk, azonban az átmosáshoz és reszuszpendáláshoz PBS helyett steril IMDM (Invitrogen, Gibco, Gaithersburg, MD) tápoldatot használtunk, és steril körülmények között dolgoztunk.

Az IMDM tápoldatot a következő anyagokkal egészítettük ki:

- 15% hőinaktivált FCS (Invitrogen)
- 160μg/ml Penicillin + Streptamycin (Biochemie Ausztria, Kundl, Ausztria)
- 2mM glutamin (Sigma-Aldrich, Disenhofen, Németország)
- 50μM β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- 100 μg/mL transzferrin (Sigma-Aldrich)
- 10 μg/mL inzulin (Sigma-Aldrich)
- 1% BSA (Invitrogen)

Az *in vitro* vizsgálatokhoz csoportonként 3-4 db állatot használtunk, a sejtkiültetések minden esetben három párhuzamossal történtek.

III.3.1. IL-3 stimulált csontvelői és léptenyészetek

A sejtek proliferációs képességének *in vitro* vizsgálatához mitogén stimulust alkalmaztunk. Mivel az IL-3 általános hematopoietikus mitogén faktor, a sejtekhez növekvő koncentrációban rekombináns egér IL-3-at adtunk (rIL-3; Serotec, MorphoSys UK Ltd, Oxford, UK), és vizsgáltuk a sejtosztódás mértékét (MTT assay-vel), a sejtek ciklusbeli állapotát (flow citometriával), valamint a sejtproliferációval összefüggésben a HDC és az IL-3 szignálkaszkád főbb jelátviteli molekuláinak mRNS expresszióját.

MTT assay

A sejtproliferáció mértékének meghatározására MTT assay-t használtunk. Az assay lényege, hogy az oldott MTT (3-[4,5-dimetil thiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólium bromid; 5mg/ml; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Németország) a sejtek mitokondriális dehidrogenázai hatására formazán kristállyá alakul, amelynek mennyisége DMSO-ban (Reanal Finomvegyszergyár Rt., Budapest) töténő oldás után spektrofotometriásan meghatározható.

Vizsgálataink során a hematopoietikus sejteket 96-lyukú plate-re (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dánia) ültettük ki, $5x10^4$ (csontvelő) és 10^6 (lép) sejt/lyuk denzitásban. A tenyészetekhez 0, 1, 5 és 10 ng/ml koncentrációban rIL-3-at adagoltunk. Négy nap múlva 20 µl MTT oldatot adtunk a tenyészetekhez, és három órán keresztül inkubáltuk őket. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk. A keletkezett kristályokat ezután 200 µl DMSO-ban oldottuk. A tökéletes oldódás érdekében a plateket rázóberendezésen rázattuk 15 percen keresztül, majd az optikai denzitást spektrofotometriásan, Multiwell ELISA leolvasó (Labsystems, Helsinki, Finnország) segítségével mértük 540 nm-en (alkalmazott háttér hullámhossz: 690 nm volt).

III.3.2. Az IL-3 receptor sejtfelszíni expressziójának *in vitro* vizsgálata

Az *in vivo* vizsgálatok kapcsán jogosan merül fel az a kérdés, hogy vajon, ugyanazt az eredményt kapjuk-e, amennyiben a vad genotípusú sejtek hisztamintermelését mesterségesen gátoljuk exogén adott antihisztamin szerekkel. Illetve konszolidálódnak-e a $HDC^{-/-}$ sejtek reakciói, ha exogén úton pótoljuk a hisztamint. Ezért a következő kísérletben vad genotípusú egerek csontvelői sejtjeit 12-lyukú plate-re ültettük ki $2x10^6$ sejt/lyuk sűrűségben. A tenyészetekhez az alábbi antihisztamin szereket adtuk a következő koncentrációkban:

- HDC-blokkoló: FMH (alfa-fluorometilhisztidin), 10^{-4} M, (Sigma-Aldrich)
- H1R-antagonista: triprolidin, 10^{-5} M, (Sigma-Aldrich)
- H2R -antagonista: ranitidin, 10^{-5} M, (Sigma-Aldrich,)
- Kezeletlen kontroll $HDC^{+/+}$ sejtek

A $HDC^{-/-}$ egerekből szeparált csontvelői sejtekhez az előzővel megegyező denzitásban kiültetve hisztamint adtunk:

- Hisztamin: 10^{-5} M, (Sigma-Aldrich)
- Kezeletlen kontroll $HDC^{-/-}$ sejtek

A sejttenyészeteket 24 és 48 óráig inkubáltuk, majd a sejteket felvettük, lecentrifugáltuk, és 1 ml PBS-ben reszuszpendáltuk. A sejtek jelölése és az IL3R expresszió mérése flow citometriás módszerrel történt (lásd alább).

III.4. ÁRAMLÁSI (FLOW) CITOMETRIÁS VIZSGÁLATOK

Kísérleteink jelentős részében flow citometriás (fluorescence activated cell sorting, FACS) módszereket használtunk a különböző immunfenotípusú hematopoietikus őssejtek, progenitorok és érett sejtek jellemzésére, valamint az általuk termelt intracelluláris vagy sejtfelszíni molekulák meghatározására.

A csontvelői és lépsejtek jellemző sejtfelszíni molekuláit 1 µl fluorokrómmal konjugált egér-ellenes antitestekkel jelöltük meg, melyeket kivétel nélkül a Becton Dickinson cégtől (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA, USA) szereztük be. Az eljárás során végig a gyártó ajánlása szerint jártunk el. A festést erre alkalmas tesztcsövekben végeztük, jelölésenként maximálisan 10^6, PBS-ben felvett sejttel. A festési protokoll minden esetben 20 percig sötétben, szobahőmérsékleten történő inkubálás, majd PBS-sel történő mosás volt. Ezután a mintákat vörösvérsejt-mentesítettük 10 perc alatt, 1 ml lizáló oldattal („BD FACS Lysing Solution"). Indirekt jelölés esetén a sejtek kimosása után a biotinkötött elsődleges antitesteket fluoreszcens festékkel jelölt Streptavidinnel hívtuk elő. Az utolsó mosást követően az üledéket reszuszpendáltuk 300µl 2%-os paraformaldehid (PFA) fixáló oldatban. A mintákat FACSCalibur™ áramlási citométerrel mértük, az eredményeket pedig a CELLQuest Pro™ szoftver segítségével analizáltuk ki. Minden mintában 25000 sejtet számoltunk le.

Az összes jelölésnél festetlen és izotípus kontrollokat használtunk az autofluoreszcencia és az aspecifikus kötődés kizárására.

III.4.1. Csontvelői érési alakok jellemzése

A érett vérsejtek meghatározásához a következő antitesteket használtuk, különböző kombinációkban:

- FITC anti-egér CD4
- FITC anti-egér F4/80
- PE anti-egér CD3
- PE anti-egér CD5
- PE anti-egér CD19
- PE anti-egér B220
- PE anti-egér Ter119
- PerCP anti-egér CD8
- APC anti-egér CD11b
- APC anti-egér CD16/CD32
- APC anti-egér CD25

A hematopoietikus progenitor- és őssejt-populációk jellemzéséhez az alábbi antitesteket alkalmaztuk:

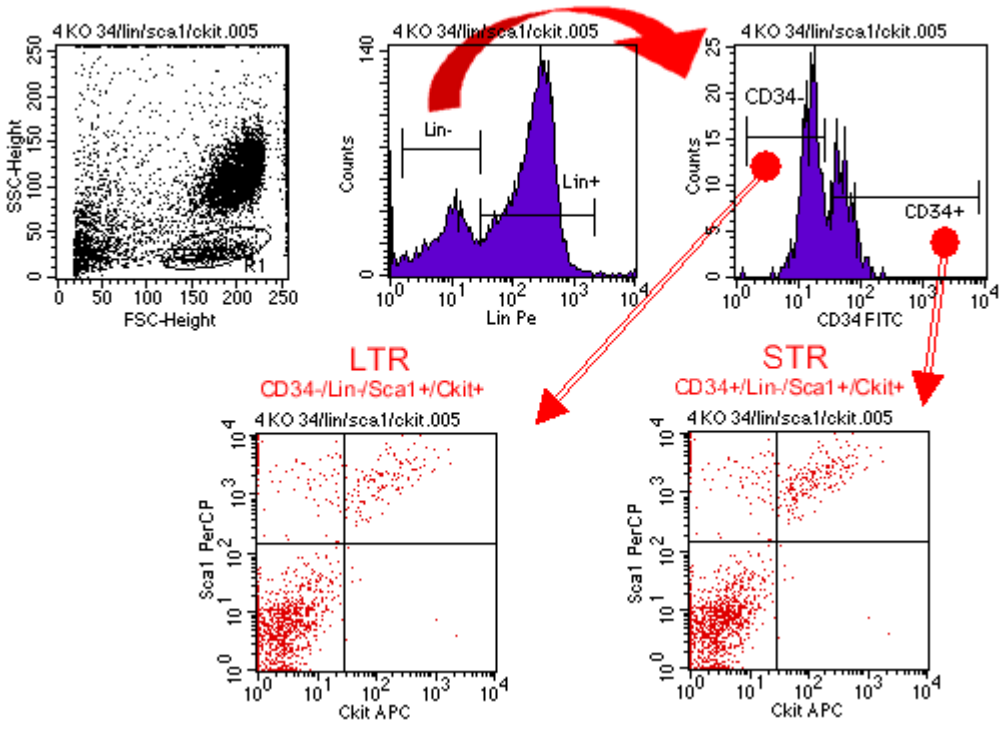
- FITC anti-egér CD34
- PE anti-egér CD3
- PE anti-egér B220
- PE anti-egér Ter119
- PE anti-egér CD11b
- Biotin anti-egér Sca1
- PerCP Streptavidin
- APC anti-egér CD117 (Ckit)

A sejteket a CD34-FITC/Lin-PE/Sca1-PerCP/Ckit-APC kombinációval jelöltük meg, ahol a Lin („lineage-koktél”) a CD3-, B220-, Ter119-, CD11b-PE jelöléseknek felelt meg.

A négyszínű flow citometriás analízis során a limfocita-blaszt populációt a méret és granuláltság alapján kikapuztuk. Elemzéseink alapja az a tapasztalati megfigyelés

volt, miszerint a csontvelőben az összes - különböző fejlődési stádiumban lévő - progenitor- és őssejt is ebben a kapuban található az érett limfociták mellett. A lineage-koktél pozitív (Lin+: CD3+/B220+/Ter119+/CD11b+) sejtek kizárása után az éretlen, Lin- sejteket vizsgáltuk. Meghatároztuk a CD34+, Ckit+ és Sca1+ sejtek százalékos eloszlását ebben a kapuban. A Lin- populáción belül kikapuztuk a CD34+ és CD34- sejteket, így attól függően, hogy melyik kaput elemeztük, meghatároztuk az úgynevezett rövidtávú repopulációra képes („short-term repopulating", STR) őssejteket, és a hosszútávú repopulációra képes („long-term repopulating", LTR) őssejteket. Az előbbit Osawa és mtsai[38] valamint Zhao és mtsai[34] a CD34+/Lin-/Sca1+/Ckit+ immunfenotípussal, az utóbbit a CD34-/Lin-/Sca1+/Ckit+ immunfenotípussal jellemezték (5. ábra).

A vizsgált sejtfelszíni antigének expresszióját a relatív fluoreszcencia intenzitás (RFI - mean channel) értékük alapján mértük össze.



5. ÁBRA: Immunfenotipizálás flow citometriás analízissel. *LTR: long-term repopulating (hosszútávú repopulációra képes) sejtek, STR: short-term repopulating (rövidtávú repopulációra képes) sejtek.*

III.4.2. Sejtfelszíni IL-3 receptor expresszió mérése

Két kísérleti rendszerben vizsgáltuk a különböző csontvelői sejtpopulációk felszíni IL-3 receptor (IL3Ra és IL3Rb) expresszióját. *In vivo* a besugárzást követő regenerációban néztük a hisztamin hiányának hatását, *in vitro* pedig a $HDC^{+/+}$ sejteket antihisztamin szerekkel kezeltük, a $HDC^{-/-}$ sejteknek kívülről pótoltuk a hisztamint.

Az alábbi antitesteket használtuk:

- FITC anti-egér CD34
- PE anti-egér CD11b
- Biotin anti-egér IL3Ra
- Biotin anti-egér IL3Rb
- PerCP Streptavidin
- APC anti-egér CD117 (Ckit)

Az antitesteket a következő kombinációkban alkalmaztuk: CD34-FITC/CD11b-PE/IL3Ra-PerCP/Ckit-APC és CD34-FITC/CD11b-PE/IL3Rb-PerCP/Ckit-APC. A négyszínű flow citometriás analízis során a különböző csontvelői sejtpopulációk (limfocita-blaszt, CD34+, Ckit+, STR [CD34+/Ckit+] és LTR [CD34-/Ckit+]) felszínén expresszálódó receptor specifikus α-, és nem-specifikus β-láncának relatív fluoreszcencia intenzitását (RFI - mean channel) értékeltük ki.

III.4.3. A H1R és H2R felszíni expressziójának vizsgálata

A hisztaminreceptorok expressziós mintázatának meghatározásához a csontvelői őssejteken az alábbi antitesteket használtuk:

- FITC anti-egér CD34
- Anti-egér H1R (nyúl)
- Anti-egér H2R (nyúl)
- PE anti-nyúl IgG
- Biotin anti-egér Sca1
- PerCP Streptavidin
- APC anti-egér CD117 (Ckit)

Nem-besugárzott vad típusú és hisztaminhiányos egerek csontvelői sejtjeit CD34-FITC/H1R-PE/Sca1-PerCP/Ckit-APC és CD34-FITC/H2R-PE/Sca1-PerCP/Ckit-APC kombinációkkal jelöltük meg. A H1R+ és H2R+ sejtek arányát és a sejtek H1R illetve H2R expresszióját (relatív fluoreszcencia intenzitást) a mieloid, limfocita-blaszt, CD34+, Ckit+, Sca1+, STR (CD34+/Sca1+/Ckit+) és LTR (CD34-/Sca1+/Ckit+) populációkon belül határoztuk meg.

III.4.4. Intracelluláris hisztamin- és HDC-tartalom mérése

A kontroll és besugárzott $HDC^{+/+}$ egerek regenerálódó csontvelői sejtpopulációinak hisztamin- és HDC-tartalmának méréséhez intracelluláris jelölési technikát használtunk. A következő antitesteket alkalmaztuk:

- FITC anti-egér CD34
- Biotin anti-egér Sca1
- PE Streptavidin
- Poliklonális anti-egér HDC (nyúl) (Promega)
- Monoklonális anti-egér hisztamin (nyúl) (Sigma-Aldrich)
- Cy5 anti-nyúl IgG (Sigma-Aldrich)
- APC anti-egér CD117 (Ckit)

A csontvelőszuszpenzióból 10^6 sejtet előírás szerint megjelöltünk CD34-FITC/Sca1-PerCP/Ckit-APC kombinációval. Vörösvérsejt-lízist, majd kimosást követően 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk a sejteket a HDC méréshez. Az intracelluláris hisztamin méréséhez a sejteket EDAC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-karbodiimid) oldatban fixáltuk. Szaponinoldattal (1% FCS, 0,1% Na-azid, 0,1% Saponin PBS-ben oldva) történő permeabilizálást követően a mintákhoz 20 μl poliklonális anti-HDC illetve 1 μl monoklonális antihisztamin jelöletlen antitestet mértünk be, melyet aztán fluoreszcens festékkel jelölt szekunder antitesttel (anti-nyúl IgG – Cy5) hívtunk elő. Az utolsó kimosás és centrifugálás után az üledéket reszuszpendáltuk 400μl 2%-os paraformaldehid (HDC-méréshez) illetve 800μl EDAC (hisztaminméréshez) oldatban. Az analízis során meghatároztuk a mieloid, limfocita-blaszt, CD34+, Ckit+, Sca1+,

STR (CD34+/Sca1+/Ckit+) és LTR (CD34-/Sca1+/Ckit+) sejtek HDC- és hisztamintartalmát, azok floureszcencia intenzitás értékeik alapján.

III.4.5. Sejtciklus-analízis

Az IL-3-mal kezelt csontvelői és lépsejttenyészeteken vizsgáltuk a proliferáló sejtek ciklusbeli állapotát abban a reményben, hogy olyan eltéréseket találunk, amelyek magyarázattal szolgálhatnak a $HDC^{-/-}$ és a vad típusú sejtek szaporodásában észlelt különbségekre.

A sejteket 12-lyukú plate-re ültettük ki, $2x10^6$ (csontvelő) és $2.5x10^6$ (lép) sejt/lyuk denzitásban. A tenyészetekhez 0, 2.5 és 10 ng/ml koncentrációban adtunk rIL-3-at. 28 óráig tartó inkubációt követően a sejteket felszuszpendáltuk és lecentrifugáltuk. A sejteket 1 ml –20°C-os 70%-os etanolban reszuszpendáltuk. 30 perces szobahőmérsékletű és 24 órás -20°C-os inkubációt követően a fixált és permeablizált sejteket lecentrifugáltuk (1000 fordulat, 1 perc), majd az üledéket reszuszpendáltuk 500µl 100µg/ml RN-áz (Sigma-Aldrich) végkoncentrációjú citromsav/Na_2HPO_4 pufferben, hogy a felesleges RNS-t elbontsuk. 20 perces inkubáció után megfestettük a mintákat propidium-jodiddal (PI, Sigma-Aldrich) 10µg/ml végkoncentrációban

A festés során a PI arányosan hozzákötődik a sejtek DNS-éhez, így a ciklusban lévő, osztódó sejtek (G_2M illetve S-fázisúak) megkülönböztethetők a nyugalmi (G_0G_1) fázisban levőktől. A limfocita-blaszt sejtek DNS-tartalmát a CellQuest Pro Software segítségével analizáltuk ki, és az FL2-A függvényében ábrázoltuk.

III.4.6. Az IL-3 jelátvitel vizsgálata

A csontvelői őssejtek jelátvitelének vizsgálatához az alábbi antitesteket használtuk:

- FITC anti-egér CD34
- FITC anti-egér CD3
- PE anti-egér P-STAT5
- PE patkány IgG
- Biotin anti-egér Sca1

- PerCP Streptavidin
- PerCP anti-egér CD8
- APC anti-egér CD117 (Ckit)
- CD32/CD16 egér Fc-receptor blokkoló antitest

Kezeletlen $HDC^{-/-}$ és $HDC^{+/+}$ egerekből (n=4-4 db) csontvelő- és lépsejt szuszpenziót állítottunk elő a már korábban leírt módon. Az eljárás során a sejtek átmosásához tápoldat helyett azidmentes 5% FCS-t tartalmazó PBS oldatot használtunk. A méréshez tesztcsövenként 10^6 kezeletlen sejtet stimuláltunk 100 ng/ml rIL-3-mal 0, 5, 10 és 20 percig, 37°C-os termosztátban. Ezt követően a sejtekhez 2 ml lizáló-fixáló puffert (PhosflowLyse/Fix Buffer, BD Biosciences) adtunk és 10 percig inkubáltuk 37°C-on. Átmosás után 90%-os metanollal permeabilizáltuk a sejteket, 30 percen át, jégen. Ezt követte a festés, melyhez először festőpufferben (2% FCS-t és 0.1% Na-azidot tartalmazó PBS-ben) mostuk át a sejteket, kétszer. A festés előtt - a gyártó ajánlása szerint - Fc-receptor blokkoló antitesttel kezeltük meg a mintákat, a nem-specifikus kötődés csökkentése céljából. Ezt követte a specifikus festés. A mintákat a következő kombinációkban festettük:

- CD34-FITC/P-STAT5-PE/Sca1-PerCP/Ckit-APC
- CD34-FITC/PatkányIgG-PE/Sca1-PerCP/Ckit-APC
- CD3-FITC/P-STAT5-PE/CD8-PerCP
- CD3-FITC/PatkányIgG-PE/CD8-PerCP

Az eljárás végén festőpufferben vettük fel a sejteket, és így kerültek mérésre. Az analízisnél az IL-3 jelátvitel során aktivált, tehát foszforilált STAT5 (phospho-STAT5, P-STAT5) molekula intracelluláris mennyiségét (relatív fluoreszcencia intenzitás értékét) határoztuk meg a limfocita-blaszt, a mieloid, valamint a különböző őssejt-, és T-sejt populációkban.

III.5. ELISA-MÉRÉSEK

A sejtfelszíni és intracelluláris mérésekkel párhuzamosan szükségesnek tartottuk a szolubilis citokinek, az IL-3 és a hisztamin szöveti szekréciójának meghatározását. A

szérumban illetve a csontvelői felülúszóban található mennyiségüket ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) módszerrel mértük meg.

A kontroll és besugárzott $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek összegyűjtött perifériás vérmintáit 10 percen át 1000-es fordulatszámon centrifugáltuk, majd a szérumot óvatosan lepipettáztuk. A csontvelői felülúszó mintákhoz az egerek humerus és femur csontjait összesen 1 ml PBS-sel mostuk át, majd a centrifugálás (3000-es fordulatszám, 5 perc) után a felülúszót óvatosan leszívtuk, és Eppendorf csövekben -20˚C-on tároltuk a felhasználásukig.

A szérum IL-3 koncentrációját a Mouse IL-3 BD OptEIA ELISA Set (Becton Dickinson) segítségével mértük meg, a gyártó előírásainak megfelelően. Az optikai denzitást spektrofotometriásan, Multiwell ELISA leolvasó (Labsystems, Helsinki, Finnország) segítségével mértük 450 nm-en (alkalmazott háttér hullámhossz: 620 nm).

A szérum illetve a csontvelői felülúszó minták hisztamintartalmának meghatározásához az EIA Histamine IM2562 Setet (Immunotech, Beckman Coulter) használtuk az előírás szerint. A mintákat 405nm-en olvastuk le.

III.6. COLONY-FORMING UNIT (CFU) ASSAY

A csontvelőben és lépben található őssejtek arányának számszerű meghatározása nem tükrözi pontosan e sejtek azirányú képességét, hogy alapvetően ezek hozzák létre a csontvelő és vér összes sejtvonalát. Szükség volt vizsgálataink során olyan funkcionális tesztre, mint az őssejtek kolóniaképzésének vizsgálata, amelyből kiderülhet, hogy ténylegesen mennyire képesek a vad típusú és a hisztaminhiányos egerek őssejtjei a különböző (eritroid, mieloid) sejtvonalakat képezni.

A CFU assay-hez először is sejtszuszpenziót állítottunk elő kezeletlen $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek (n=3-3 db) csontvelejéből és lépéből a már korábban leírt módon. Az eljárás során steril körülmények között dolgoztunk és steril IMDM tápfolyadékot használtunk. 3 cm átmérőjű Petri csészékbe $2x10^4$ sejtet ültettünk ki speciális, metilcellulóz tartalmú médiumba (MethoCult M3434, Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Kanada), mely tartalmazza a sejtek szaporodásához és differenciálódásához szükséges citokineket, az eritropoietinnel együtt. Minden mintából három párhuzamos mérés készült. A tenyészeteket 37°C-on, 5%-os CO_2-dal, 100%-os páratartalomban

inkubáltuk termosztátban. A legalább 40 sejtből álló progenitor kolóniaformáló egységeket különböző időkben olvastuk le egy Olympus IMT-2 Invertoscope (Hamburg, Németország) mikroszkóp segítségével. A 7. napon az eritroid kolóniákat különítettük el (BFU-E: burst-forming unit-erythroid), a 13. napon az úgynevezett multilineage (több sejtvonalat képző) kolóniák, azaz a granulocita-eritroid-megakariocita-makrofág (CFU-GEMM) és a granulocita-makrofág (CFU-GM) kolónia is megkülönböztethető már. A kolóniákról fényképeket készítettünk egy Olympus 4.1 Mpx CAMEDIA digitális kamera segítségével, a csontvelő esetében 40x-es, a lépkolóniákról 150x-es nagyítással.

A kolóniák leszámolását követően az egyes kolóniákat speciális végű Pasteur pipettával kiemeltük a metilcellulóz médiumból, és összegyűjtöttük mRNS izolálás céljából. A sejteket 1 ml tápoldattal felszuszpendáltuk, hogy a maradék metilcellulóz is feloldódjon, majd lecentrifugáltuk és RNS pufferben vettük fel a sejteket. A mintákat -70°C-on tároltuk a felhasználásukig. A kolóniák HDC, H4R, IL3Ra, STAT5a és MAPK1 expresszióját vizsgáltuk.

III.7. RNS IZOLÁLÁS, REVERZ TRANSZKRIPCIÓ ÉS REAL-TIME PCR

Az intracelluláris és sejtfelszíni fehérje-meghatározásokkal párhuzamosan megvizsgáltuk a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ sejtek génexpresszióját, hogy a hisztamin általi szabályozás különböző szintjeibe nyerjünk betekintést. mRNS expressziós vizsgálatot végeztünk tehát mind a besugárzást követően a regenerálódó csontvelői sejtekből, mind a 28 órán át IL-3-mal stimulált csontvelői- és léptenyészetekből, valamint a CFU-assay izolált kolóniáiból.

RNS izolálás

Kétféle RNS izolálási technikát alkalmaztunk kísérleteinkben. A csontvelő-regenerációs modellben az izolálást TRI reagens segítségével (TRI Reagent BD, Sigma-Aldrich) végeztük, az IL-3-kezelt csontvelői- és léptenyészetek, valamint a CFU assay kolóniái esetén az RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) használtuk, a gyártók előírásainak megfelelően. Az RNS-minták integritását 2%-os agaróz gélelektroforézis segítségével, tisztaságát és mennyiségét pedig spektrofotometriásan, 260/280 nm-en állapítottuk meg

egy NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

DNS emésztés és reverz transzkripció (RT)

A DNS emésztéshez és reverz transzkripcióhoz szükséges összes reagenst a Promega cégtől (Madison, WI, USA) szereztük be. A tiszta, DNS-mentes RNS minták érdekében a mintákat DNase I kezelésnek vetettük alá. Ennek során az RNS mintákat μg-ként 1 μl DNase I és 1 μl 10x pufferrel inkubáltuk 30 percen keresztül 37°C-on, majd a DNS emésztést a gyártó által megadott STOP oldattal állítottuk le úgy, hogy 1 μl oldatot a mintákhoz adva 10 percig 65°C-on inkubáltuk őket. Ezután 2 μg totál RNS-t egy Gene Ataq Controller standard PCR (polimeráz láncreakció) készülékkel (Pharmacia LKB, Uppsala, Svédország) cDNS-sé (complementary DNS-sé) írtunk át az alábbiak szerint:

RT reakcióelegy (40 μl):

- 4 μl 10x puffer
- 8 μl $MgCl_2$
- 4 μl dNTP mix
- 2 μl RN-áz inhibitor
- 1 μl random hexamer primerek
- 1 μl reverz transzkriptáz
- 2 μg RNS
- Desztillált víz ad 40 μl

Hőmérsékleti program: 42°C (45 perc) - 99°C (5 perc) - Hűtés

Real-time PCR

Az átírt cDNS-ekből Taqman rendszeren alapuló kvantitatív real-time (valós idejű) PCR vizsgálatokat AbiPrism® 7000 real-time PCR automatával (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) végeztük, a gyártó előírása alapján. Az alábbi, az AbiPrism real-time PCR-platformhoz a kereskedelemben elérhető Taqman próbakészleteket használtuk fel: mHDC, mIL3Ra, mSTAT5a, mMAPK1, mH1R, mH2R, mH4R. Belső (housekeeping) kontrollként mHGPRT próbát használtunk.

A PCR reakciókat 96-lyukú plate-eken végeztük. A reakció előtt elkészítettük a próbák és a reakcióelegy keverékeit (lyukanként 1,3 μl próba és 12,5 μl Taqman

Universal PCR Mix, Applied Biosystems) illetve a reverz transzkripcióból származó cDNS hígított oldatát (lyukanként 2 µl cDNS és 9,2 µl desztillált víz), majd az oldatokat a lyukakba pipettáztuk. A teljes térfogat 25 µl/lyuk volt. A real-time PCR-protokollt templát nélküli negatív kontrollok jelenlétében végeztük, valamennyi mintából két párhuzamos mérést végeztünk. A kapott eredményeket a komparatív C_T-módszer segítségével értékeltük ki. Az eredményeket a megfelelő housekeeping mRNS-szintekre vonatkoztattuk.

III.8. AZ APOPTÓZIS VIZSGÁLATA

Eddig leírt kísérleteinkben a hisztaminnnak a proliferációra gyakorolt szabályozó hatását vizsgáltuk. Azonban nem kizárt, hogy a hisztamin, mint általános túlélési faktor, szükséges a sejtek túléléséhez, és így a hiánya apoptózist indukálhat. Ezért vizsgálatokat végeztünk a sejthalálra gyakorolt szerepét illetően is.

III.8.1 A kísérleti rendszereink apoptózis vizsgálatához

III.8.1.1. In vivo besugárzás

Hisztaminmentes tápon tartott $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek 4 Gy összdózisú egésztest-besugárzásban részesültek. A besugárzást követő 2. és 6. órában és az 1. napon, a korábban leírt módon, csontvelői sejtszuszpenziókat állítottunk elő. A továbbiakban flow citometriás méréseket végeztünk a főbb apoptotikus molekulákra (lásd alább).

III.8.1.2. In vitro besugárzás

A komplex *in vivo* rendszerek mellett *in vitro* kísérleti rendszereket is vizsgáltunk. Vad típusú és hisztaminhiányos egerekből nyert csontvelői sejteket kiültettünk 12-lyukú plate-re, $2x10^6$ sejt/lyuk sűrűségben, steril IMDM médiumban. A tenyészeteket ezt követően besugaraztuk 4 Gy összdózissal, majd flow citometriás analízist végeztünk 2 óra valamint 6 óra elteltével.

III.8.1.3. In vitro etopozid-indukció

A következő *in vitro* rendszerünkben ismételten azt teszteltük, hogy vajon hasonló eredményeket kapunk-e antihisztamin szerek alkalmazásával illetve a hisztamin pótlásával, mint az *in vivo* kísérletekben. A $HDC^{+/+}$ egerek csontvelői sejttenyészetéhez az alábbi antihisztamin szereket adtuk a következő koncentrációkban:

- HDC-blokkoló: FMH, 10^{-4} M,
- H1R-antagonista: triprolidin, 10^{-5} M,
- H2R-antagonista: ranitidin, 10^{-5} M,
- Kezeletlen kontroll $HDC^{+/+}$ sejtek

A $HDC^{-/-}$ egerekből szeparált csontvelői sejtekhez pedig hisztamint adtunk:

- Hisztamin: 10^{-5} M,
- Kezeletlen kontroll $HDC^{-/-}$ sejtek

A sejtenyészeteket 24 óráig inkubáltuk termosztátban, majd etopozidot (Sigma-Aldrich) adtunk hozzájuk 10^{-6} M koncentrációban. Újabb 4 órás inkubációt követően a sejteket lecentrifugáltuk, és 1 ml PBS-ben reszuszpendáltuk. A sejtek jelölése flow citometriás módszerrel történt (lásd alább).

III.8.2. Az apoptózis flow citometriás vizsgálata

A fentebb leírt rendszerek mindegyikéből történt flow citometriás analízis. A jelölések a már korábban részletezett sejtfelszíni és intracelluláris metodikákkal történtek. A csontvelői őssejtek apoptózisának vizsgálatához az alábbi antitesteket használtuk:

- FITC anti-egér CD3
- FITC anti-egér CD34
- FITC Avidin
- PE anti-egér Kaszpáz-3
- PE anti-egér CD95/Fas
- PerCP Streptavidin
- PerCP anti-egér CD19
- APC anti-egér CD117 (Ckit)

- APC anti-egér CD25
- Biotin anti-egér CD95L/FasL
- PI

A sejteket a következő kombinációkban jelöltük meg a különböző kísérletekben:

- CD34-FITC/CD95-PE/CD95L-PerCP/Ckit-APC
- CD3-FITC/CD95-PE/CD95L-PerCP/CD25-APC
- CD95L-FITC/CD95-PE/CD19-PerCP
- CD34-FITC/Kaszpáz3-PE/Ckit-APC
- PI

Az analízis során meghatároztuk az apoptózisra jellemző molekulák (CD95, CD95L, intracelluláris kaszpáz-3) expresszióját a különböző csontvelői sejtpopulációkon: a limfocita-blaszt, a B- és T-sejt populációkban, valamint az őssejtekben, a CD34+, Ckit+, STR (CD34+/Ckit+) és LTR (CD34-/Ckit+) populációkban.

A PI festék a sejtek DNS-éhez arányosan kötődik. Az analízis során a G_2 fázisban elpusztusztult sejtek fragmentálódott DNS darabjai az egészséges, G_0 fázisú sejtekétől balra elkülönülő populációt alkotnak, melynek aránya meghatározható.

III.9. STATISZTIKAI ELEMZÉSEK

Minden kísérletünket legalább kétszer megismételtük, a mérések közötti eltérés 10%-on belül mozgott, eredményeink reprodukálhatók voltak. Az adatok statisztikai feldolgozását a STATISTICA 7.1™ szoftvercsomag (StatSoft Inc.) segítségével végeztük. Az értékelt adatcsoportok és a rájuk ható faktorok számától, az adatcsoportok adatainak eloszlásától és szórásainak homogenitásától függően kétmintás t-próbát, egyfaktoros ismétléses varianciaanalízist (One-Way Repeated Measures ANOVA), kétfaktoros varianciaanalízist (Two-Way ANOVA), és kétfaktoros, ismétléses varianciaanalízist (Two-Way Repeated Measures ANOVA) használtunk, szükség szerint. *Post hoc* tesztként a Holm-Sidak tesztet alkalmaztunk. A mintacsoportok közötti különbségeket 0,05-ös hibaküszöb alatti p-értékek esetén tekintettük szignifikánsnak. Ábráinkon az adatok átlagértékét ± a standard hibát tüntettük fel.

IV. Eredmények

IV.1. HDC$^{+/+}$ ÉS HDC$^{-/-}$ EGEREK NYUGALMI ÉS STRESSZ-INDUKÁLT CSONTVELŐI VÉRKÉPZÉSÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Jelen tanulmány alapja az a hipotézis volt, miszerint a hisztamin befolyásolja a hematopoietikus sejtekre jellemző alapvető funkciókat, úgyismint a proliferációt, a differenciálódást, és a regenerációra való képességet. Ennek megfelelően kísérleteink első felében a csontvelői sejtek vérképző funkcióját hasonlítottuk össze hisztaminhiányos és vad genotípusú egerekben.

IV.1.1. A HDC$^{-/-}$ egerek nyugalmi vérképzése összességében normálisnak bizonyult

Legelőször is azt vizsgáltuk, hogy a hisztamin hiányában vajon eltér-e a vér alakos elemeit képező sejtvonalak aránya a csontvelőben, illetve, hogy a vérképzés kimenetén, azaz a perifériában megmutatkoznak-e az esetleges eltérések (4. táblázat).

A perifériás vér elemzése nem hozott statisztikailag szignifikáns eltérést a hematológiai paraméterekben. Mindazonáltal a HDC$^{-/-}$ egerek fehérvérsejtszáma konzisztensen magasabb volt az ismételt kísérletekben. Ezzel párhuzamosan a csontvelői cellularitás is magasabb volt, bár ismételten éppen a szignifikanciahatár felett ($p=0.06$).

A sejtszámok meghatározását követően flow citometrás analízist végeztünk, hogy a különböző immunfenotípussal jellemezhető sejtek arányát meghatározzuk. A perifériás vérben ismételten nem találtunk eltérést a két állatcsoport között. A csontvelőben azonban, a limfocita-blaszt kapun belül, a hisztaminhiányos egerekben jelentősen csökkent az úgynevezett „lineage”-negatív (Lin-) sejtek aránya. Ezen sejteket a kísérletünkben használt antitestek alapján úgy jellemeztük, mint CD3-/B220-/Ter119-/CD11b- sejtek, és ez a populáció foglalja magába az egyik sejtvonal irányában sem elkötelezett prekurzor és őssejteket. A CD34+ populáció, valamint a rövidtávú repopulációs kapacitással rendelkező (short-term repopulating, STR) őssejtek, és a hosszútávú repopulációs kapacitással rendelkező (long-term repopulating, LTR)

őssejtek arányának szignifikáns csökkenése tehető felelőssé a Lin- populáció csökkenéséért a hisztaminhiányos egerekben. Az STR sejteket az CD34+/Lin-/Sca1+/Ckit+, az LTR sejteket a CD34-/Lin-/Sca1+/Ckit+ immunfenotípussal jellemeztük. Ezen eredemények megegyeznek a $HDC^{-/-}$ egereken végzett előzetes adatainkkal[224].

	HDC+/+	HDC-/-	szignifikancia
Perifériás vér			
FVS (10*9/l)	4,9 ± 0,4	5,4 ± 0,5	n.sz.
VVS (10*12/l)	8,4 ± 0,3	8,0 ± 0,2	n.sz.
FACS analízis (%)			
B sejtek (B220+)	35,2 ± 2,6	36,5 ± 7,2	n.sz.
T sejtek (CD3+)	32,8 ± 2,2	32,3 ± 2,8	n.sz.
Th sejtek (CD3+/CD4+)	25,4 ± 2,5	24,8 ± 2,0	n.sz.
Tc sejtek (CD3+/CD8+)	5,1 ± 0,5	5,0 ± 0,8	n.sz.
NK sejtek (CD16/32+)	31,6 ± 2,7	39,2 ± 6,2	n.sz.
Csontvelő (10*6 sejt/ml)			
Totál sejtszám	7,6 ± 0,7	9,4 ± 0,7	n.sz.
FACS analízis (%)			
B sejtek (CD19+)	37,8 ± 0,8	43,4 ± 14,0	n.sz.
T sejtek (CD3+)	10,4 ± 3,9	14,4 ± 2,1	n.sz.
Th sejtek (CD4+)	12,1 ± 2,6	8,8 ± 1,3	n.sz.
Tc sejtek (CD8+)	8,4 ± 1,9	7,0 ± 1,0	n.sz.
CD4+/CD5+	9,2 ± 1,6	8,3 ± 1,3	n.sz.
CD8+/CD25+	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	P < 0,05
CD25+	3,5 ± 0,3	2,3 ± 0,2	P < 0,05
Ter119+	18,6 ± 2,4	18,7 ± 2,4	n.sz.
CD11b+	5,1 ± 0,3	7,0 ± 0,6	P < 0,05
F4/80+	14,9 ± 0,8	14,3 ± 0,6	n.sz.
Lin-	27,8 ± 1,8	19,6 ± 0,5	P < 0,05
CD34+	22,1 ± 3,5	11,0 ± 1,2	P < 0,05
Ckit+	25,0 ± 2,0	21,7 ± 1,0	n.sz.
Sca1+	55,8 ± 0,7	51,7 ± 2,6	n.sz.
STR	51,5 ± 3,2	41,0 ± 1,9	P < 0,01
LTR	5,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2	P < 0,001

4. TÁBLÁZAT: A $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek perifériás vérének és csontvelejének sejtösszetétele. *A sejtszámokat hematológiai automatával mértük. A sejtpopulációk immunfenotipizálása és a limfocita-blaszt kapun belüli arányának meghatározása flow citometriás módszerrel történt. Az eredmények csoportonként n=6 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a méréseket 5 független kísérletben ismételtük. A statisztikai szignifikanciát Student-féle t-teszttel számoltuk ki.*

A Lin- sejtek arányának csökkenésével egyidejűleg a Lin+ sejtarány természetszerűleg magasabbnak mutatkozott. Ennek hátterében a CD11b+ (mieloid) sejtek %-ának szignifikáns emelkedését tapasztaltuk. Az elkötelezett sejtek arányának jelentős növekedése és a tény, hogy a periférián különbséget nem találtunk, azt sugallja, hogy a hisztamin a vérképző sejtek differenciálódását is befolyásolja.

IV.1.2. A hisztaminhiányos egerek csontvelejében kevesebb a hematopoietikus őssejt

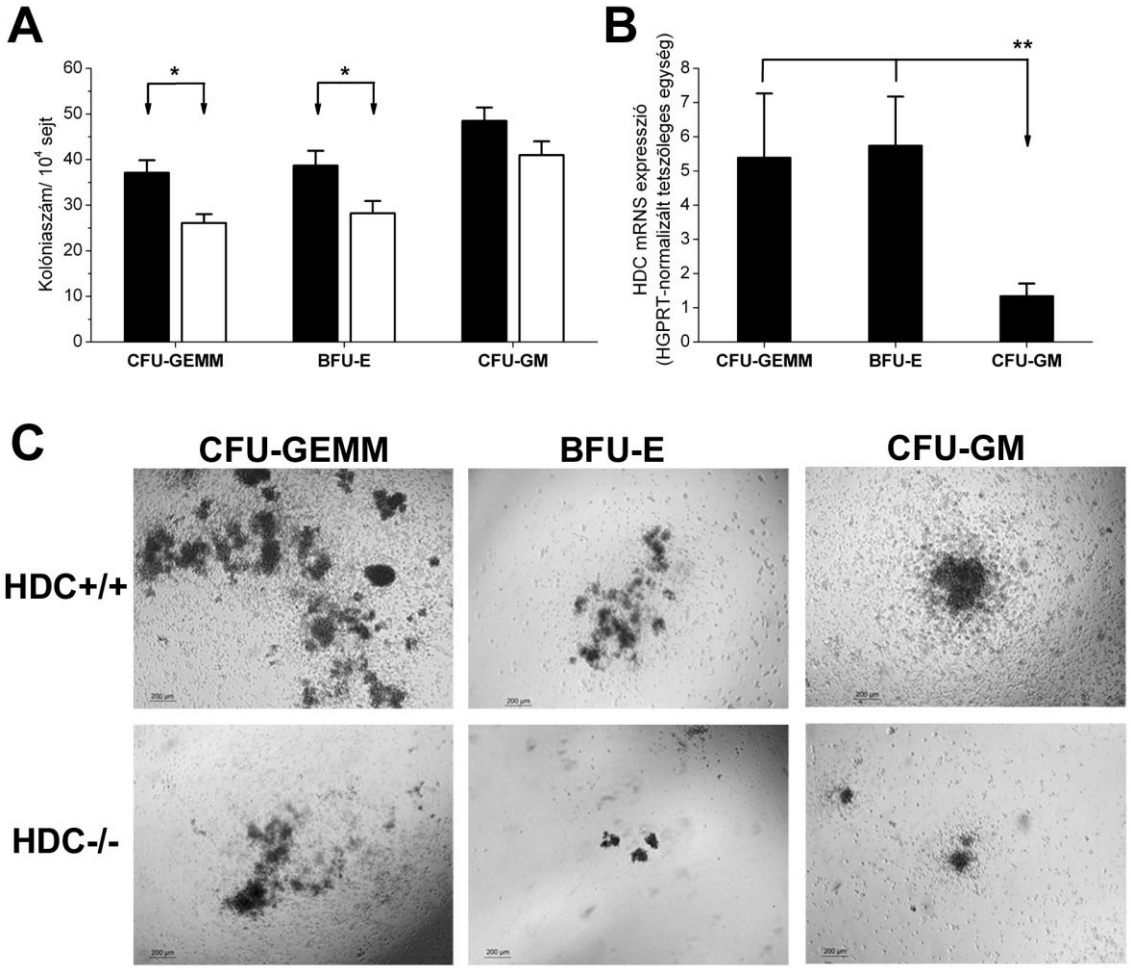
Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a csontvelőben az őssejtarányokban tapasztalt eltérések funkcionálisan is megjelennek-e, $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek csontvelői sejtjeit szemiszolid médiumba ültettük ki, mely tartalmazta az őssejtek osztódásához szükséges változatos növekedési faktorokat. A csontvelőben található pluripotens őssejtek szaporodásnak indulnak, és meghatározott idő múlva a belőlük kialakult kolóniák leszámolhatók. Az így kapott szám arányos a csontvelő funkcióját ellátni képes őssejtek számával. A módszer által továbbá következtethetünk a differenciálódási képességükre is, ugyanis meghatározhatók a pluripotens CFU-GEMM, a mieloid CFU-GM és az eritroid BFU-E őssejtkolóniák.

Az 6.A. ábra mutatja eredményeinket, melyek szerint a BFU-E és a CFU-GEMM kolóniák száma jelentősen csökkent a $HDC^{-/-}$ csontvelőben: az előbbi 27.0 ± 8.4%-kal, az utóbbi 29.6 ± 7.2%-kal a vad típushoz képest. Mindazonáltal a granulocita-makrofág progenitorok (CFU-GM) számában nem találtunk érdemleges különbséget.

A kísérlet rávilágított arra is, hogy a sejtek osztódási kapacitása is elégtelenné válik a hisztamin hiányában. Az 6.B ábra fényképein láthatók a méretbeli különbségek a két genotípus között: a vad típusú sejtek kolóniái következetesen nagyobbak lettek, mint a hisztaminhiányos kolóniák.

Végül demonstráltuk a vad genotípusú csontvelőben, hogy a korai hemato-poietikus progenitorok bizony termelik a HDC enzimet (6.C ábra). Ez összhangban van az irodalomban újabban közölt eredményekkel, melyek szerint az őssejtek a proliferációjukkal és elköteleződésükkel párhuzamosan expresszálják a HDC-t[35,80-81,194]. Az összes általunk vizsgált gén közül a HDC mRNS expressziója volt a legnagyobb mértékű a kolóniákban. A populációk közül a CFU-GM sejtek szignifikánsan – csaknem négyszer – kevesebb HDC-t termeltek a többihez képest. Mivel a CFU-GM

sejtek már egy differenciáltabb lépcsőt képviselnek, ez magyarázhatja a kisebb mértékű HDC-termelésüket, viszont alá is támasztja a fenti eredményt, miszerint nem volt különbség a CFU-GM kolóniák számában a hisztaminmentes egerekben.



<u>6. ÁBRA:</u> HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (□) egerek csontvelői korai vérképző progenitorainak *in vitro* kolóniaképző képessége. ***A)*** *A multilineage (CFU-GEMM, CFU-GM) és eritroid (BFU-E) progenitor kolóniák száma, 10^4 kiültetett sejtre vonatkoztatva.* ***B)*** *A HDC mRNS expressziója a kolóniaképző progenitorokban. A HDC$^{+/+}$ egerek izolált kolóniáiból mRNS-t szeparáltunk, majd real-time PCR-t végeztünk.* ***C)*** *A kétféle egér kolóniáinak típusos megjelenése 7 nap (BFU-E) illetve 13 nap (CFU-GEMM, CFU-GM) inkubációt követően. A jelölő 200 um-nek felel meg. Az adatok az átlagértékeket ± a standard hibát tüntetik fel, genotípusonként 3 állatot használva, 3 párhuzamos méréssel, két független kísérletben ismételve. A statisztikai szignifikanciát a Student-féle t-teszttel határoztuk meg a CFU-assay-nél, és egyfaktoros ismétléses varianciaanalízissel az RNS-mérésnél; (*) p<0.05, (**) p<0.01.*

IV.1.3. A besugárzás-indukált csontvelő-regeneráció késik a HDC$^{-/-}$ egerekben

In vivo modellrendszerünkben szubletális egésztest-besugárzást alkalmaztunk, hogy a csontvelőt kimerítsük, és spontán regenerációra késztessük a progenitor és őssejt-populációkat a HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerekben. Ez a modell ideális arra, hogy teszteljük az őssejtek azon képességét, hogy mennyire képesek a hematopoietikus stresszt követően helyreállítaniuk a csontvelői homeosztázist a hisztamin hiányában. Természetesen a teljes regenerációs folyamat ilyenkor hetekig-hónapokig eltart. Kísérleteinkben mi a regeneráció a korai szakát (0-14. nap) vizsgáltuk.

A 7.A-C ábrán látható a besugárzás hatása a perifériás és a csontvelői sejtszámok alakulására a HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerekben. A csontvelői cellularitást súlyosan érintette a besugárzás, a mélypontot a 3. napon érte el mindkét vizsgálati csoportban. Ezt követően, a 7. napra a sejtszámok csaknem négyszeres emelkedést mutattak a vad típusú egerekben. A hisztaminmentes egerek csontvelői sejtszáma azonban mégcsak nem is duplázódott meg a 7. napra, így szignifikánsan elmaradt a vad típusú egerekhez képest. A 14. napra a HDC$^{-/-}$ egerek csontvelője a nyugalmi szint 40.8 ± 2.8%-ára emelkedett mindössze, míg a HDC$^{+/+}$ sejtszámok a kontroll 73.2 ± 4.5%-ára. Érdekes módon nem volt szignifikáns különbség a perifériás vérsejtszámokban a két egércsoport között, csak a fehérvérsejtszámokban észleltünk enyhe elmaradást a HDC$^{-/-}$ egerekben a 14. napon, ez megfelelt a csontvelői elmaradás következményének ($p<0.1$).

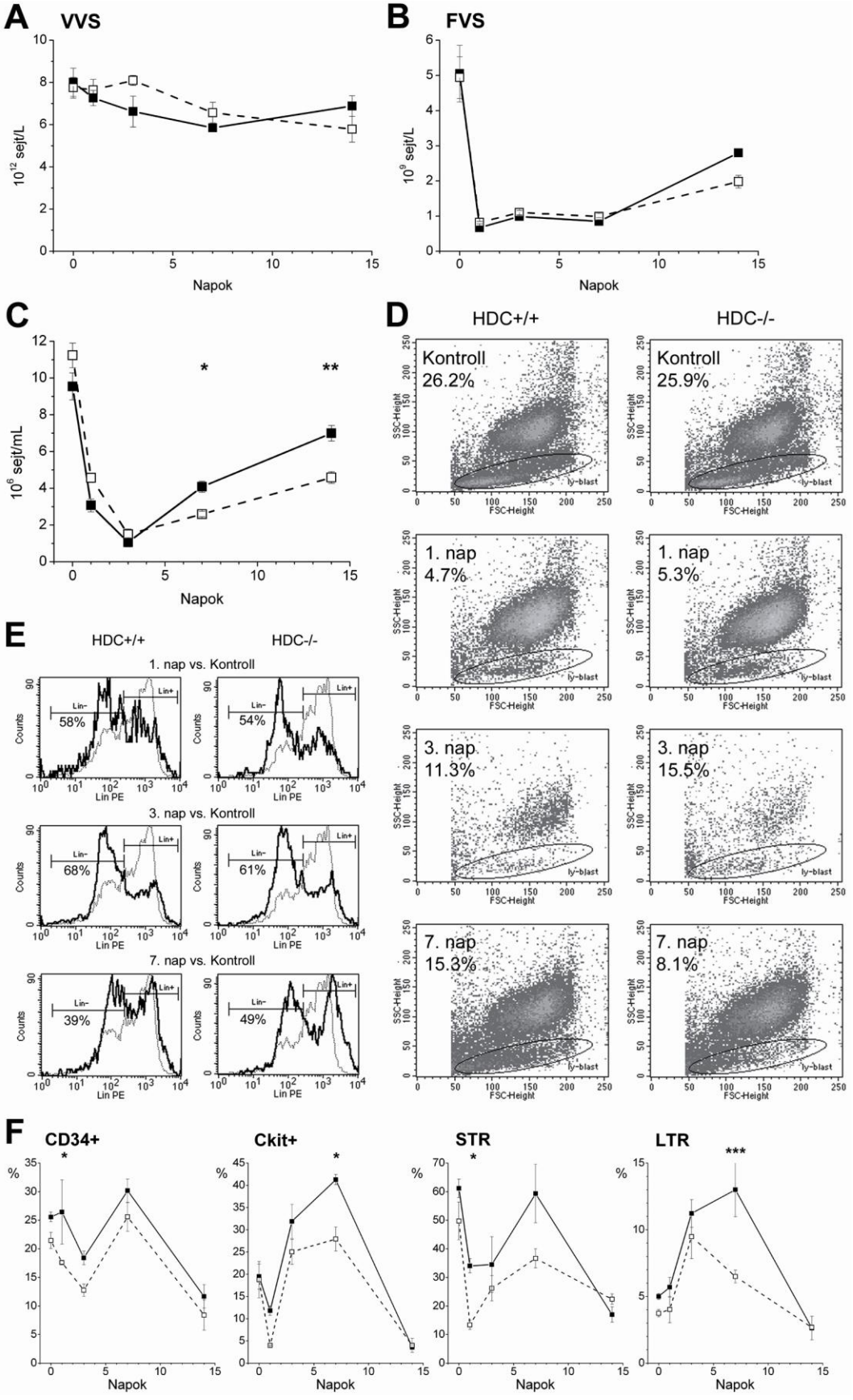
Ezután a különböző regenerálódó sejtpopulációk kinetikáját elemeztük flow citometriás módszerrel, hogy megtaláljuk azokat a populációkat, amelyek felelősek lehetnek a csontvelői sejtszámok változásáért a HDC$^{-/-}$ egerekben. A 7.D ábra mutatja, hogy mindkét egércsoport a limfocita-blaszt kapu súlyos citopéniájával reagált a besugárzásra. Míg azonban a HDC$^{+/+}$ populáció majdnem teljesen helyreállt a 7. napra (a csontvelői összsejtszám 17.1 ± 1.0%-át képezve), addig a hisztaminmentes egereké jelentősen alulmaradt a regenerálódásban (9.2 ± 0.9%-on; $p<0.05$). A 7.E ábrán látható, hogy a besugárzást követő első naptól emelkedik a Lin- populáció aránya a limfocita-blaszt kapuban. Ez az emelkedés a 3. napon tetőződik a vad típusú egerekben, azt az időszakot jelezvén, amikor a prekurzor sejtek rapidan proliferálnak, hogy helyreállítsák a csontvelőt. A 7. napon az értékek visszatérnek a kontroll szintre (35.9 ± 0.8%), az elkötelezett alakok arányának egyidejű növekedésével. Ezzel szemben, a HDC$^{-/-}$

egerekben a Lin- populáció emelkedése szignifikánsan elmarad a vad típusúhoz képest az 1-3. napon, és nem tér vissza a kontroll szintre a 7. napon (49.1 ± 1.5%, $p<0.05$), ami egy még mindig aktívan zajló, de nem hatékony regeneratív folyamatot jelez.

Kísérletünkben tovább analizáltuk a különböző immunfenotípussal jellemezhető őssejt-populációkat. A 7.F ábrán látható, hogyan alakult a besugárzást követően a CD34+, a Ckit+, az STR és az LTR sejtek aránya. Kezdetben, a sugárhatás miatt a populációk enyhe csökkenést mutattak, kivéve a nyugalomban lévő LTR sejteket. Ezt követően a sejtek aránya emelkedett, a maximumot a 7. napon érték el. A hisztamin hiányában, azonban a kezdeti csökkenés nagyobb mértékű volt, ezt leginkább az STR és a CD34+ sejtekben láttuk. A regeneratív emelkedés a 3. és a 7. nap között szintén késlekedett, és bár az STR sejtek esetén is elmaradást láttunk, statisztikailag szignifikáns különbséget csak az LTR és a Ckit+ sejtek esetén észleltünk. Így a $HDC^{-/-}$ egerekben az LTR sejtek aránya a kontroll 173.5 ± 15.8%-ára emelkedett (a $HDC^{+/+}$ 260.1 ± 49.7%-ához képest), a Ckit+ sejteké pedig 148.8 ± 14.5%-ra emelkedett (a $HDC^{+/+}$ 212.0 ± 5.9%-ához képest). Ezek az adatok összhangban vannak a hisztamin-hiányos egerek csontvelői sejtszámában - az ugyanebben az időszakban - észlelt alacsonyabb értékekkel, és azt sugallják, hogy a hisztamin hiánya főként az LTR és a Ckit+ sejtek repopulációs képességét érinti.

A besugárzást követő 14. napra az összes populáció aránya csaknem normalizálódott. Noha ezen a napon a csontvelői cellularitásban jelentős, a perifériás fehérvérsejt-számban pedig enyhe különbség mutatkozott $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek között, a regenerálódó őssejt-populációkban nem találtunk eltérést. Ez az eredmény, és a Lin+ populáció változásai mind azt a feltevésünket támasztja alá, miszerint a hisztamin nemcsak a sejtek proliferációjában, hanem differenciálódásukban is kiemelt szerepet játszik.

Hasonló eltéréseket tapasztaltunk bizonyos korai hematopoietikus markerek sejtfelszíni expressziójában, azaz a fehérjék relatív fluoreszcencia intenzitásban. Ezek a molekulák kapcsolódási pontokat biztosítanak a csontvelői strómához, ezáltal segítik az őssejtek funkcióit. Kísérleti modellünkben a CD34 és a Sca1 fehérjék besugárzást követő fokozódó expressziója már az első naptól kezdve szignifikánsan elmaradt a $HDC^{-/-}$ egerekben. A Ckit expressziója fordított irányban változott, de itt is elmaradást detektáltunk hisztamin hiányában.


A
VVS
10^{12} sejt/L
Napok
B
FVS
10^{9} sejt/L
Napok
C
10^{6} sejt/mL
*
**
Napok
D
HDC+/+
HDC-/-
Kontroll
26.2%
Kontroll
25.9%
1. nap
4.7%
1. nap
5.3%
3. nap
11.3%
3. nap
15.5%
7. nap
15.3%
7. nap
8.1%
SSC-Height
FSC-Height
ly-blast
E
HDC+/+
HDC-/-
1. nap vs. Kontroll
58%
54%
3. nap vs. Kontroll
68%
61%
7. nap vs. Kontroll
39%
49%
Lin-
Lin+
Counts
Lin PE
F
CD34+
Ckit+
STR
LTR
*
*
*
***
%
Napok

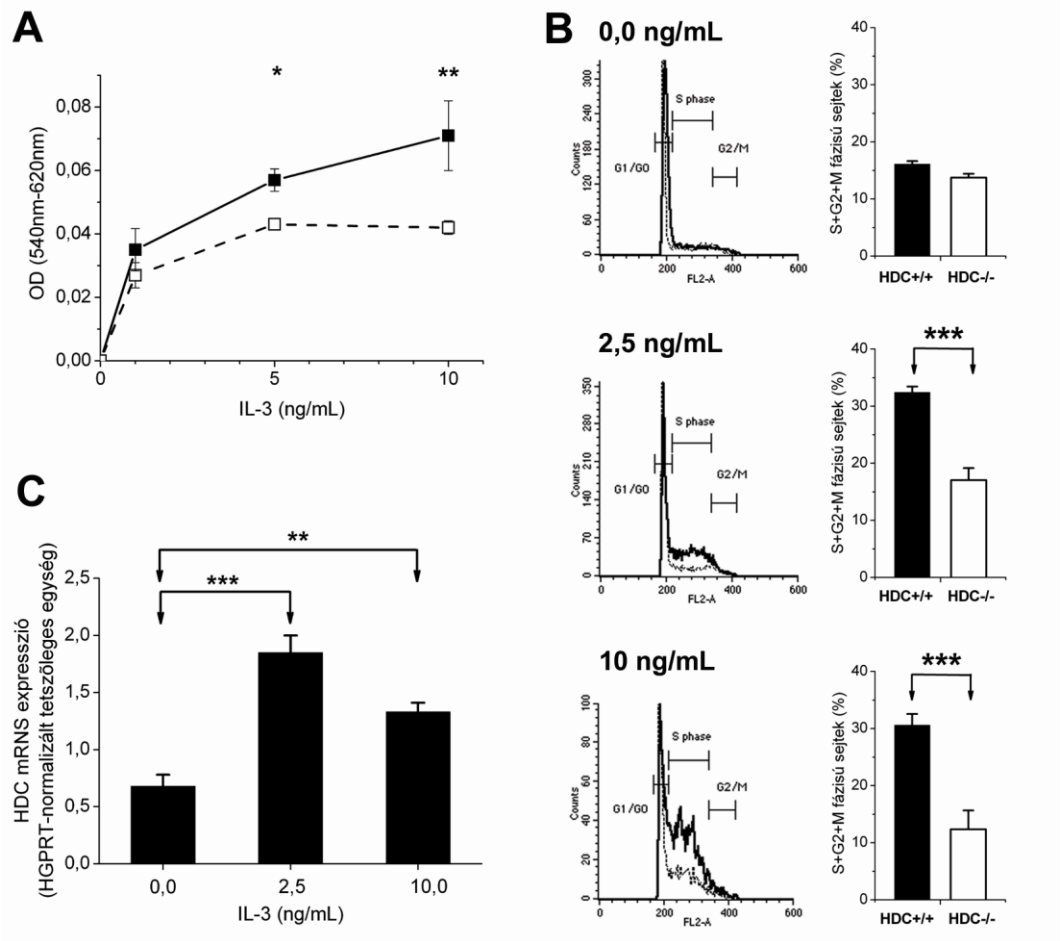
7. ÁBRA: A perifériás vérkép és a sejtpopulációk alakulása HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (□) egerek csontvelő-regenerációja alatt, 4 Gy egésztest-besugárzást követően, az 1., 3., 7. és 14. napon. ***A-B)*** *A perifériás vörösvér- (VVS) és fehérvérsejtszámok (FVS) változásai.* ***C)*** *A csontvelői cellularitás alakulása.* ***D)*** *A csontvelői sejtpopulációkat 4-színű flow citometriás módszerrel analizáltuk. Az ábrán reprezentatív dot plot ábrák láthatók, ahol a limfocita-blaszt populációt kikapuztuk, és a csontvelői arányát tüntettük fel.* ***E)*** *A kétféle egér Lineage-negatív (Lin-) és –pozitív (Lin+) populációinak alakulása a limfocita-blaszt kapun belül. A Lineage koktél a következő antitest-kombinációból állt: CD3+/B220+/Ter119+/CD11b+, így a Lin- sejtek az éretlen progenitoroknak felelnek meg. A reprezentatív hisztogramokon a besugarazott minták (vastag vonal) és a kontroll minták (vékony vonal) Lin- populációinak arányát hasonlítottuk össze. A kontroll minták Lin- sejtaránya 27% volt a HDC$^{+/+}$ egerekben, és 21% volt a HDC$^{-/-}$ egerekben.* ***F)*** *A regenerálódó csontvelői progenitorsejtek kinetikája. A CD34+ és a Ckit+ sejtek arányát a limfocita-blaszt kapun belül, az STR és az LTR sejtek arányát a Lin-/CD34+ ill. Lin-/CD34- kapun belül határoztuk meg. Az adatpontok az ábrákon n=6 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a kísérletet 3-szor ismételtük. A statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001.*

IV.1.4. A hisztaminmentes sejtek csökkent proliferációs válaszokat mutatnak IL-3 kezelésre

A kolóniaformáló assay és a regenerációs vizsgálat azt jelzik, hogy a hisztaminnak fontos szerepe lehet a hematopoietikus őssejtek osztódásában. Ezért a következőkben megvizsgáltuk, hogyan reagálnak a HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerek csontvelői sejtjei mitogén stimulusra. Mitogén stimulusként az IL-3-at használtuk, mivel a legtöbb őssejt és érett sejt osztódását, vagy önmagában, vagy más növekedési faktorral együtt alkalmazva[51]. Ahhoz, hogy kizárjuk a hisztamin szisztémás hatását, *in vitro* modellt állítottunk fel, melyben mindkét genotípusú egér csontvelői sejtjeit kiültettük, és megkezeltük növekvő koncentrációjú IL-3-mal. A proliferációt az MTT assay segítségével mértük, amely szignifikáns csökkenést mutatott a hisztaminmentes sejtek osztódásában (8.A ábra).

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a hisztaminhiányos őssejtek elégtelen osztódása lehet-e az eltérő sejtciklus állapotuk következménye. Propidium-jodidos festést követően sejtciklus-analízist végeztünk flow citometriás módszerrel az IL-3-mal kezelt csontvelői sejteken (8.B ábra). Nyugalmi helyzetben az osztódó (S+G_2+M) fázisban lévő limfocita-blaszt sejtek százalékos aránya nem különbözött a HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerek mintáiban. Azonban IL-3 kezelésre az osztódó sejtek aránya csökkent a vad típushoz képest. Mindazonáltal a különbségek nagyobb mértékűek voltak az

S-fázisú sejtek esetén, mint a G_2M fázisúakban; ez utóbbiak esetén a csökkenés nem volt statisztikailag szignifikáns. Ez utalhat arra, hogy a hisztamin szabályozza a sejtciklusba való belépést, illetve befolyásolja a szintetikus fázis folyamatait. Ezt alátámasztja az a megfigyelés, miszerint a vad genotípusú egerek csontvelői sejttenyészetében szignifikánsan megnő (csaknem megháromszorozódik) a HDC mRNS expressziója az IL-3 kezeléssel párhuzamosan (8.C ábra).



8. ÁBRA: A hisztamin hiányának hatása a vérképző sejtek osztódására. *$HDC^{+/+}$ (■) és $HDC^{-/-}$ (□) egerek csontvelői sejtjeit növekvő dózisú IL-3-mal inkubáltuk együtt, $5x10^4$ (A) és $2x10^6$ (B) sejt/lyuk denzitásban.* ***A)*** *A proliferációt a 4. napon mértük meg MTT-assay segítségével.* ***B)*** *Sejtciklus-analízist végeztünk 28 órát követően a $HDC^{+/+}$ (vastag vonal) és $HDC^{-/-}$ (szaggatott vonal) egerek mintáiban, flow citometriás módszerrel, Propidium-jodid festést alkalmazva. Az oszlopdiagrammok az osztódó (S+G2+M fázisú) sejtek arányát mutatják a limfocita-blaszt kapun belül.* ***C)*** *A HDC mRNS szintjének növekedése IL-3-kezelést követően, $HDC^{+/+}$ egerek sejtkultúráiban, real-time PCR-rel mérve. A kísérletekhez genotípusonként 4 állatot használtunk, 3 párhuzamos méréssel, két független kísérletben ismételve. Adatpontok: átlag ± SEM. A statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros, a HDC-méréshez egyfaktoros ismétléses varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) $p<0.05$, (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$.*

Ezek az adatok azt sugallják, hogy a hisztamin módosítja a hematopoietikus sejtek IL-3-ra adott proliferációs válaszát, és *in vitro* demonstrálják, hogy hisztamin hiányában a proliferatív képesség károsodik.

IV.2. ŐSSEJT-POPULÁCIÓK HDC ÉS HISZTAMINTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA A CSONTVELŐ-REGENERÁCIÓ SORÁN. A HISZTAMIN-RECEPTOROK SZEREPE A VÉRKÉPZÉSBEN

IV.2.1. A HDC és a hisztamin intracelluláris szintje megnő a besugárzást követően a regenerálódó sejtpopulációkban

Számos tanulmány számol be a hisztaminnak és szintetizáló enzimjének, a HDC-nek a kimutatásáról különböző osztódó-differenciálódó sejtekben[35,80-81,132,136]. Ez felvetette azt a kérdést, hogy a mi csontvelői rendszerünkben is mérhető-e a hisztamin és a HDC, illetve a termelődésük indukálódik-e a vad genotípusú, regenerálódó sejtpopulációkban.

Ezért először is megmértük a különböző csontvelői őssejt-populációk, azaz a CD34+, Ckit+, Sca1+, STR (CD34+/Sca1+/Ckit+) és LTR (CD34-/Sca1+/Ckit+) sejtek intracelluláris HDC és hisztamintartalmát a besugárzás-indukált csontvelő-regenerációs modellünkben. Az általunk vizsgált valamennyi sejtpopulációban kimutatható volt a HDC enzim és a hisztamin jelenléte, azonban mennyiségük eltérést mutatott a sejtek proliferációs képességétől függően.

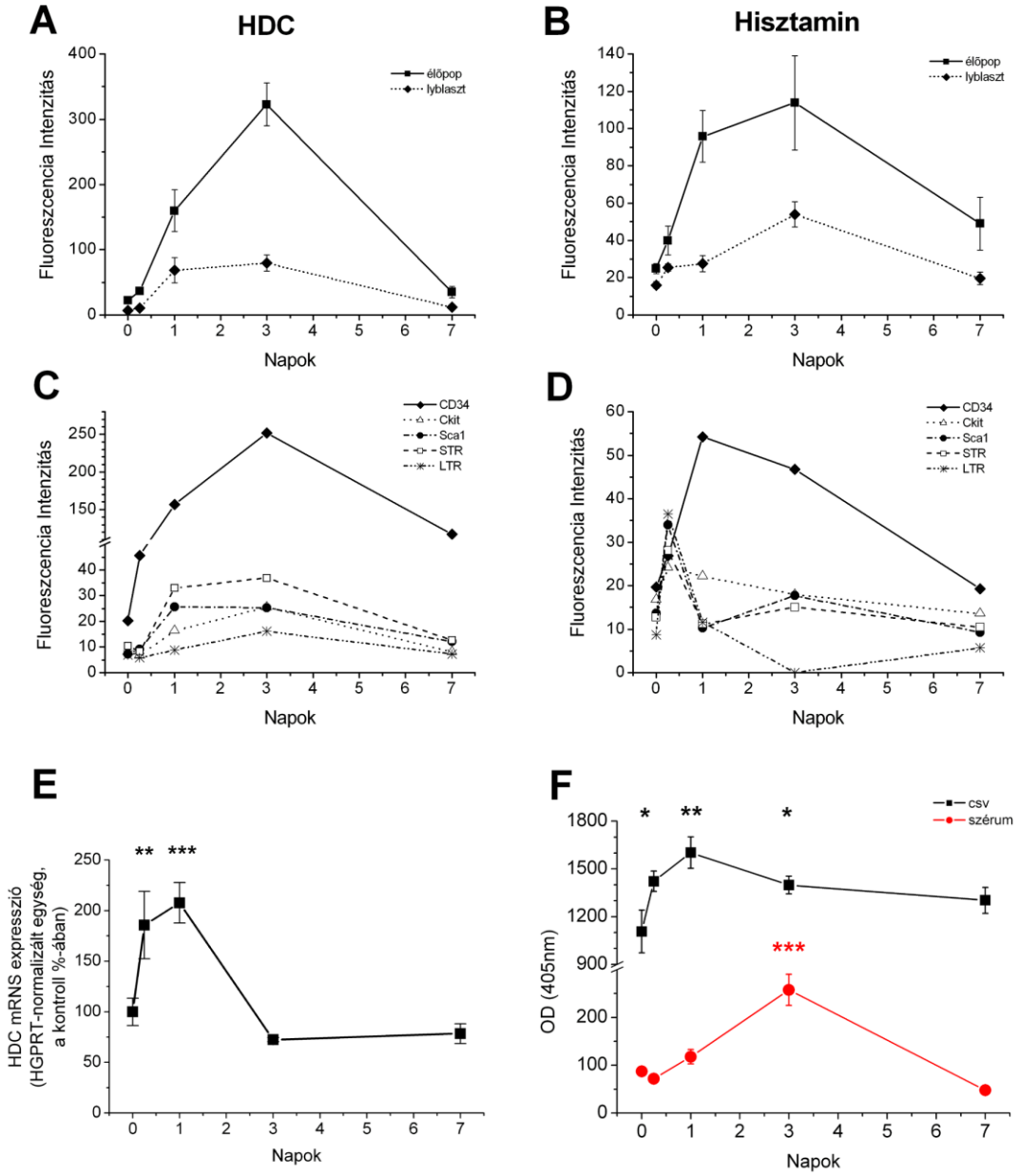
Amint azt a 9.A-C ábra mutatja, a regeneráció beindulásával párhuzamosan az őssejtek HDC-tartalma szignifikánsan megnő a besugárzást követő első naptól kezdve. A legkisebb mértékű (alig kétszeres) emelkedést az LTR sejtekben láthatjuk, ami korrelálhat ezen sejtek alacsonyabb osztódási kapacitásával. A legnagyobb (10-szeresnél is nagyobb) mértékű emelkedést a CD34+ sejtek mutatták, ami összhangban van azzal, hogy ezek a sejtek intenzív osztódáson és differenciálódáson mennek keresztül a csontvelő regeneráció során.

Ami az őssejtek hisztamintartalmát illeti, már a 6. órában jelentős (3-4-szeres) növekedés észlelhető az összes populációban (9.B-D ábra). A legnagyobb mértékű emelkedést ebben az esetben az LTR sejtekben detektáltuk. Az LTR sejtek azok, amelyeket a legkevésbé károsítja a sugárzás. Ezt többnyire megmagyarázza a nyugalmi állapotuk, azonban a hisztamin is szerepet játszhat azokban a folyamatokban, melyek a

károsodástól védik ezeket a sejteket. Mindazonáltal a kezdeti növekedést követően a sejtek hisztamintermelése gyorsan visszatér a kontroll szintre, kivéve a CD34+ populációt, amelyben az emelkedett hisztamintartalom még a 3. vizsgálati napon is kimutatható volt.

A sejtek intracelluláris HDC-tartalmával párhuzamosan megmértük a HDC mRNS expressziót a csontvelőben. A 9.E ábra mutatja, hogy főleg a besugárzást követő 6. órában és az első napon észleltünk szignifikáns emelkedést. Noha az expresszió csökken a 3. napra, a sejtek továbbra is emelkedett HDC tartalma magas transzlációs aktivitást jelez, amit alátámaszt az az irodalmi adat, miszerint a HDC aktivitás mRNS upreguláció nélkül is magas lehet[136].

Nemcsak a hisztamin intracelluláris szintjét mértük meg, hanem a csontvelői környezet és a szérum hisztamintartalmát is (9.F ábra). Ezek szintén emelkedést mutattak, de a kinetikájuk inkább hasonlított a HDC enzim változására, mint az intracelluláris hisztaminéra. Ebből arra következtettünk, hogy emelkedett HDC tartalom mellett az őssejtek hisztamintartalma azért alacsony a regeneráció során, mert a megtermelt hisztamint azonnal kibocsátják a környezetükbe.



<u>9. ÁBRA:</u> A HDC és hisztamin szintjének alakulása HDC$^{+/+}$ egerek csontvelejében, a 4 Gy besugárzást követő 6. órában, 1., 3. és 7. napon. *A-D)* *Az intracelluláris HDC- és hisztamintartalom változása a különböző regenerálódó sejtpopulációkban. A sejteket a CD34-FITC/Sca1-PE/HDC-Cy5 ill. Histamine-Cy5/Ckit-APC kombinációval festettük meg, és a HDC illetve a hisztamin fluoreszcencia intenzitását (FI) mértük meg a sejtpopulációkban flow citometriával. A HDC-tartalom növekedése szignifikáns volt ($p<0.05$) az 1. és a 3. napon az összes populációban, valamint a 7. napon a CD34+ és az Sca1+ sejtekben. A hisztamintartalom növekedése szignifikáns volt a 6. órában mindegyik populációban, és az 1. és a 3. napon a CD34+, az 1. napon a Ckit+ és a 3. napon a limfocita-blaszt és az Sca1+ sejtekben.* ***E)*** *A HDC mRNS expressziójának változása real-time PCR-rel mérve.* ***F)*** *A csontvelői mosófolyadék és a szérum hisztamin szintjének alakulása ELISA módszerrel mérve. Az adatpontok az ábrákon n=5 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a statisztikai szignifikanciát egyfaktoros ismétléses varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) $p<0.05$, (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$.*

IV.2.2. A hisztamin hiánya negatívan befolyásolja a csontvelői sejtek felszíni hisztaminreceptor expresszióját

Az 5. táblázat foglalja össze a flow citometriás adatokat a hisztamin H1 és H2 receptorainak felszíni expresszióját a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek csontvelői őssejtjein. Habár az irodalmi adatok szerint a H4R is expresszálódik hematopoietikus sejteken, ezt flow citometriás módszerrel nem tudtuk vizsgálni, mert az egér H4R-t specifikusan felismerő ellenanyag a vizsgálatok idején nem volt elérhető a kereskedelmi forgalomban. A hisztaminhiányos egerek őssejt-populációin belül kevesebb a H1R+ sejtek aránya, szignifikáns mértékben a CD34+ és a Ckit+ sejtek között. A H2R expresszióban a tendenciák hasonlók, bár nem szignifikánsak. Hisztamin hiányában eltérő az egyes sejttípusok HR expressziós mintázata is: míg a vad genotípusú LTR sejtek azonos mértékben expresszálják a H1R-t és a H2R-t, a $HDC^{-/-}$ egerek LTR sejtjei jelentősen kevesebb H2R-t expresszálnak a felszínükön.

Szoros kapcsolat figyelhető meg a különböző proliferációs aktivitású, vad genotípusú sejtek HR expressziója valamint a HDC- és hisztamintartalma között. Azok a populációk, amelyek a legtöbb H1R+ és H2R+ sejtet tartalmazzák, azaz a CD34+ és az STR sejtek, egybeesnek azokkal a sejtekkel, amelyek a legnagyobb HDC- és hisztamintermelést mutattak (9.A-D ábra).

	H1R+ sejtek (%)			H2R+ sejtek (%)		
Sejtpopulációk	**HDC+/+**	**HDC-/-**	**szignifikancia**	**HDC+/+**	**HDC-/-**	**szignifikancia**
mieloid	23,9 ± 4,0	10,9 ± 3,8	n.sz.	8,8 ± ,9	6,2 ± ,6	n.sz.
limfocita-blaszt	25,0 ± 5,0	11,7 ± 1,9	n.sz.	11,3 ± 2,0	6,9 ± 0,6	n.sz.
CD34+	38,6 ± 1,4	18,0 ± 5,0	P < 0,05	20,6 ± 2,3	16,0 ± 2,1	n.sz.
Ckit+	17,3 ± 3,9	6,0 ± 1,0	P < 0,05	6,5 ± 3,2	1,8 ± 0,6	n.sz.
Sca1+	15,0 ± 3,9	11,0 ± 3,6	n.sz.	8,2 ± 5,3	4,4 ± 1,1	n.sz.
STR	80,5 ± 6,5	57,2 ± 9,1	n.sz.	48,5 ± 8,2	40,9 ± 3,2	n.sz.
LTR	23,6 ± 2,5	35,2 ± 4,1	n.sz.	24,2 ± 8,8	19,7 ± 3,6	n.sz.

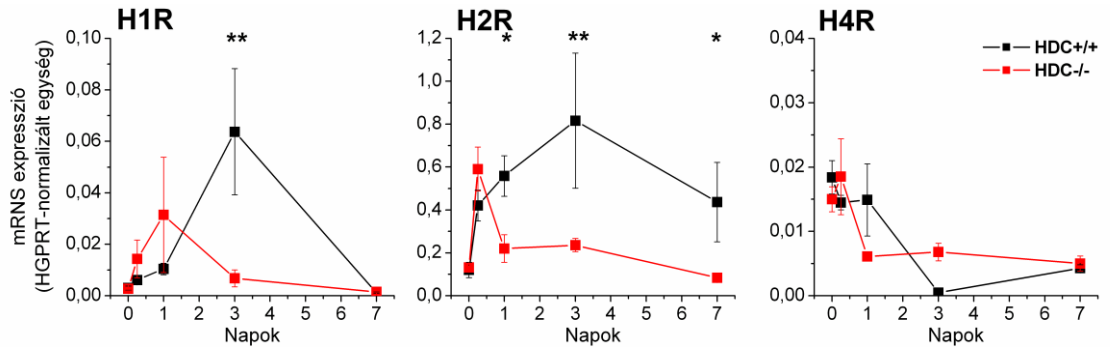
5. TÁBLÁZAT: A hisztamin H1 és H2 receptorainak felszíni expressziója különböző vérképző sejteken, $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerekben. *A feltüntetett adatok a H1R+ és H2R+ sejtek arányát mutatják a specifikus populációkon belül, flow citometriás módszerrel mérve. Az eredmények csoportonként n=3 adat átlagának (± SEM) felelnek meg. A statisztikai szignifikanciát Student-féle t-teszttel számoltuk ki.*

IV.2.3. A H1R és H2R mRNS szintje megnő a besugárzást követően, azonban a H4R expressziója csökken

A következő vizsgálatban megnéztük, hogy vajon a hisztamin H1, H2 és H4 receptorának génexpressziója követi-e a regenerálódó csontvelői sejtek megnövekedett HDC- és hisztamintermelését (10. ábra). A vad genotípusú egerekben a H1R és a H2R szignifikánsan emelkedik a besugárzást követő 6. órától kezdve, és a regenerációval párhuzamosan emelkedett szinten marad a 7. napig. A H4R mRNS expressziója azonban úgy tűnik, leregulálódik a besugárzást követően.

A hisztaminreceptorok felszíni expressziójával ellentétben a H1R, H2R és a H4R transzkripciós szintű expressziójában nem találtunk eltérést a kontroll $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek között. Besugárzást követően azonban a hisztaminhiányos egerek H1R és H2R mRNS szintje a kezdeti emelkedést követően gyorsan lecsökkent a kontroll szintre, így szignifikáns különbség alakul ki a két egércsoport expressziója között a regeneráció alatt. A H4R expressziójában eltérés nem mutatkozott.

Összegezve, összefüggés mutatható ki a HDC és hisztamin fokozott termelődése és a HR-ok expressziója között a csontvelő regenerációja során, azonban valószínűleg a H4R nem játszik szerepet ebben a folyamatban.



10. ÁBRA: A hisztamin H1, H2 és H4 receptorok mRNS expressziójának alakulása $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek csontvelő-regenerációja alatt, real-time PCR-rel mérve. *Az adatpontok az ábrákon n=5 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05, (**) p<0.01.*

IV.3. AZ IL-3 JELÁTVITEL ÖSSZEHASONLÍTÁSA $HDC^{+/+}$ ÉS $HDC^{-/-}$ EGEREKBEN

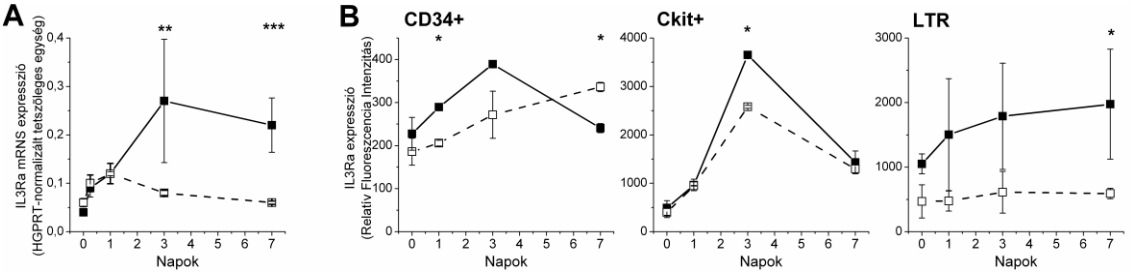
A hisztamin hiányában tapasztalt regeneráció-késlekedés és elégtelen proliferációs válasz felvetette a kérdést, hogy vajon hol lehet a szabályozási zavar a $HDC^{-/-}$ egerek sejtjeiben. Tekintettel arra, hogy kísérleteinkkel sikerült igazolnunk azt, hogy a hisztamin módosítja a hematopoietikus sejtek IL-3-ra adott proliferációs válaszát, feltételeztük, hogy hisztamin hiányában sérülhet az IL-3 jelátviteli útvonala.

Ennek igazolására elsőként ELISA módszerrel meghatároztuk az IL-3 szintjét $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek szérumában, a besugárzást követően. Eredményeink szerint az IL-3 szérum szintje mérsékelten, de nem szignifikánsan, alacsonyabbnak bizonyult a hisztaminhiányos egerek mintáiban, mint a vad genotípusú egerekben. Ugyanakkor figyelembe kell vennünk azt a tényt, miszerint a szérum szintek változásai nem feltétlen tükrözik a csontvelői mikrokörnyezet változásait, ezért megmértük a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek különböző csontvelői sejtpopulációinak intracelluláris IL-3 szintjeit flow citometriás módszerrel, a besugárzást követő 3. napon. Eredményeink szerint a hisztamin hiányában több sejtpopuláció IL-3 szintje jelentősen lecsökkent. A legnagyobb mértékű különbségeket a mieloid vonal sejtjeiben, a CD11b+ mieloid prekurzorokban, az F4/80+ monocita-makrofág sejtekben, az ECP+ (eozinofil kemotaktikus potein pozitív) eozinofil granulocitákban, valamint a VCAM1+/CD45- strómasejtekben láttuk.

IV.3.1. $HDC^{-/-}$ sejtek IL-3 receptor expressziója elmarad a regeneráció során

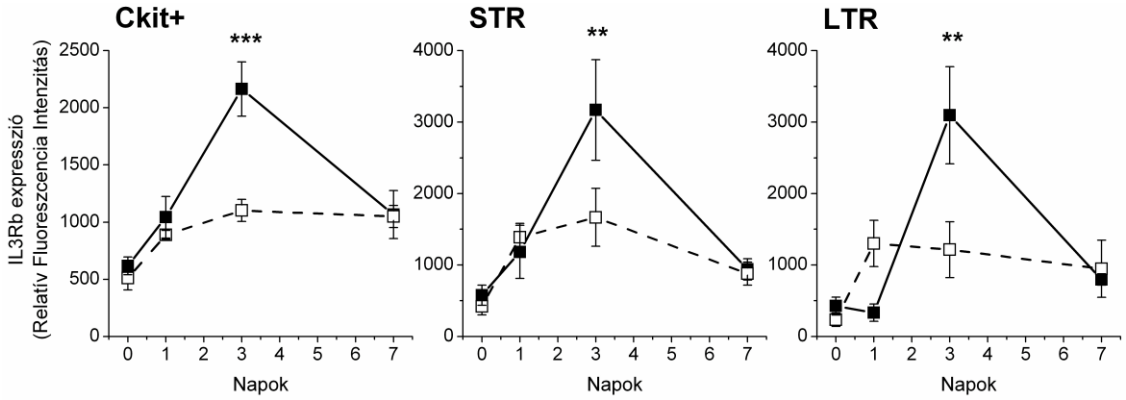
Ahhoz, hogy felmérjük, hogy a hisztamin befolyásolja-e az IL-3 jelátvitelét, először is megvizsgáltuk az IL-3 receptor specifikus láncának, az IL3Ra-nak a sejtfelszíni fehérje és mRNS szintű expresszióját a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek csontvelő-regenerációja során (11.A-B ábra). A kontrollokban mindkét egércsoport hasonló expressziót mutatott. Ugyanakkor a csontvelői stresszhatást követően már láthatók voltak a különbségek: míg a vad típusú egerek regenerálódó sejtjeiben az IL3Ra expressziója gyorsan emelkedésnek indult a besugárzást követően (csaknem 6-szorosára nőtt az mRNS szint, és 2-6-szorosára a felszíni fehérje a 3. napon), addig a hisztaminhiányos egerek sejtjeiben csak enyhe növekedés volt kimutatható. A 7. napra, noha az mRNS termelés

továbbra is magas volt, a receptorok száma a regenerálódó populációk felszínén visszacsökkent a normálishoz közeli értékre. Kivételt képezett az LTR populáció, amely továbbra is igen aktívan termelte az IL3Ra-t, szemben a $HDC^{-/-}$ egerek LTR sejtjeivel.



<u>11. ÁBRA:</u> Az IL-3 receptor alfa lánc (IL3Ra) expressziójának analízise $HDC^{+/+}$ (■) és $HDC^{-/-}$ (□) egerek csontvelő-regenerációja alatt, 4 Gy egésztest-besugárzást követően, a 6. órában, 1., 3. és 7. napon. ***A)*** *Az IL3Ra mRNS expressziója, real-time PCR-rel mérve.* ***B)*** *Az IL3Ra felszíni expressziója a regenerálódó csontvelői sejtpopulációkon, flow citometriás módszerrel mérve. Az IL3Ra relatív fluoreszcencia intenzitását a CD34+, a Ckit+ és az LTR (CD34-/Ckit+) sejteken tüntettük fel. Az adatpontok az ábrákon n=6 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a kísérleteket kétszer ismételtük. A statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) $p<0.05$, (**) $p<0.01$, (***) $p<0.001$.*

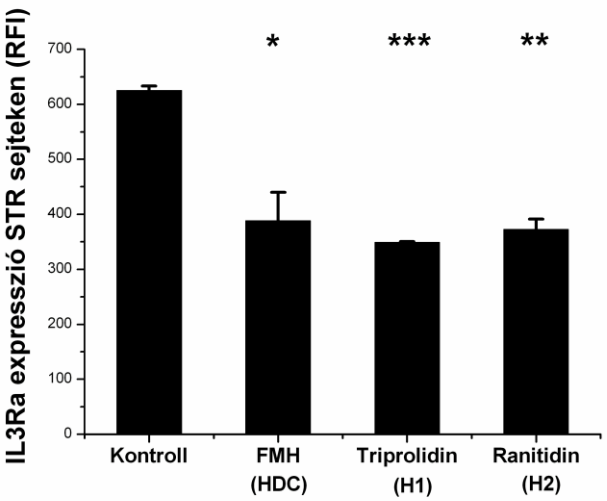
A 12. ábra mutatja az IL3R nem-specifikus béta láncának sejtfelszíni mérésével kapott eredményeinket. Látható, hogy az IL3Rb besugárzást követő emelkedése kinetikájában megegyező a specifikus láncéval, azonban a vad típusú és a hisztaminhiányos egerek közötti különbségek nagyobb mértékűek az IL3Rb esetében. Ennek az lehet az oka, hogy az IL3Rb szerves része más növekedési faktorok, úgymint a GM-CSF és az IL-5 mitogén jeleinek közvetítésének is, ezért hisztamin hiányában ezek a hatások ebben az *in vivo* rendszerben összeadódhatnak, és nagyobb különbséget okozhatnak. Egyben az eredményeink azt is jelzik, hogy a hisztamin hiánya negatívan befolyásolhatja ezen növekedési faktorok jelátvitelét is.



12. ÁBRA: Az IL-3 receptor béta lánc (IL3Rb) felszíni expressziójának analízise HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (□) egerek regenerálódó csontvelői sejtpopulációin, 4 Gy egésztest-besugárzást követően, az 1., 3. és 7. napon. *Az IL3Rb relatív fluoreszcencia intenzitását a Ckit+, az STR (CD34+/Ckit+) és az LTR (CD34-/Ckit+) sejteken tüntettük fel. Az adatpontok az ábrákon n=6 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a kísérleteket kétszer ismételtük. A statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (**) p<0.01, (***) p<0.001.*

IV.3.2. A hisztaminhatás *in vitro* gátlása befolyásolja az IL-3 receptor felszíni expresszióját

Tekintettel az *in vivo* rendszer összetett voltára, ahhoz, hogy kizárjuk az egyéb behatások lehetőségét, megvizsgáltuk vad genotípusú sejtek IL3Ra és IL3Rb expresszióját *in vitro*, a hisztaminszintézis gátlása illetve a hisztaminreceptorok blokkolása mellett. Eredményeinkkel igazoltuk, hogy mind a szintézis, mind pedig a hisztaminhatás receptoriális gátlásának hatására lecsökken az IL-3 receptorok felszíni expressziója, hasonlóan a HDC$^{-/-}$ egerekben tapasztaltakhoz (13. ábra). Ezt a csökkenést mindkét receptor altípus esetében észleltük, azonban az IL3Rb-nél a különbségek nagyobb mértékűek voltak. A csökkent receptor expressziót főleg a limfocita-blaszt, az STR, a Ckit+ és a CD34+ sejtek mutatták, érdekes módon *in vitro* az LTR sejteken nem detektáltuk azt a jelentős különbséget, amit az *in vivo* rendszerben. Ez azt sugallja, hogy az LTR sejteken *in vivo* egyéb tényezők is befolyásolják a hisztamin hatását.



13. ÁBRA: HDC$^{+/+}$ egerek csontvelősejtjeinek IL3Ra expressziójának alakulása *in vitro*, a hisztamin szintézisének illetve a receptorainak gátlására. *A hisztamin szintézisét FMH-val (10^{-4} M), a H1R-t Triprolidinnel (10^{-5} M), a H2R-t Ranitidinnel (10^{-5} M) blokkoltuk 48 óráig. Az IL3Ra felszíni expresszióját a különböző sejtpopulációkon flow citometriás módszerrel mértük. Az IL3Ra relatív fluoreszcencia intenzitását az STR (CD34+/Ckit+) sejteken tüntettük fel. Az adatpontok az ábrákon n=5 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a kísérleteket kétszer ismételtük. A statisztikai szignifikanciát egyfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001.*

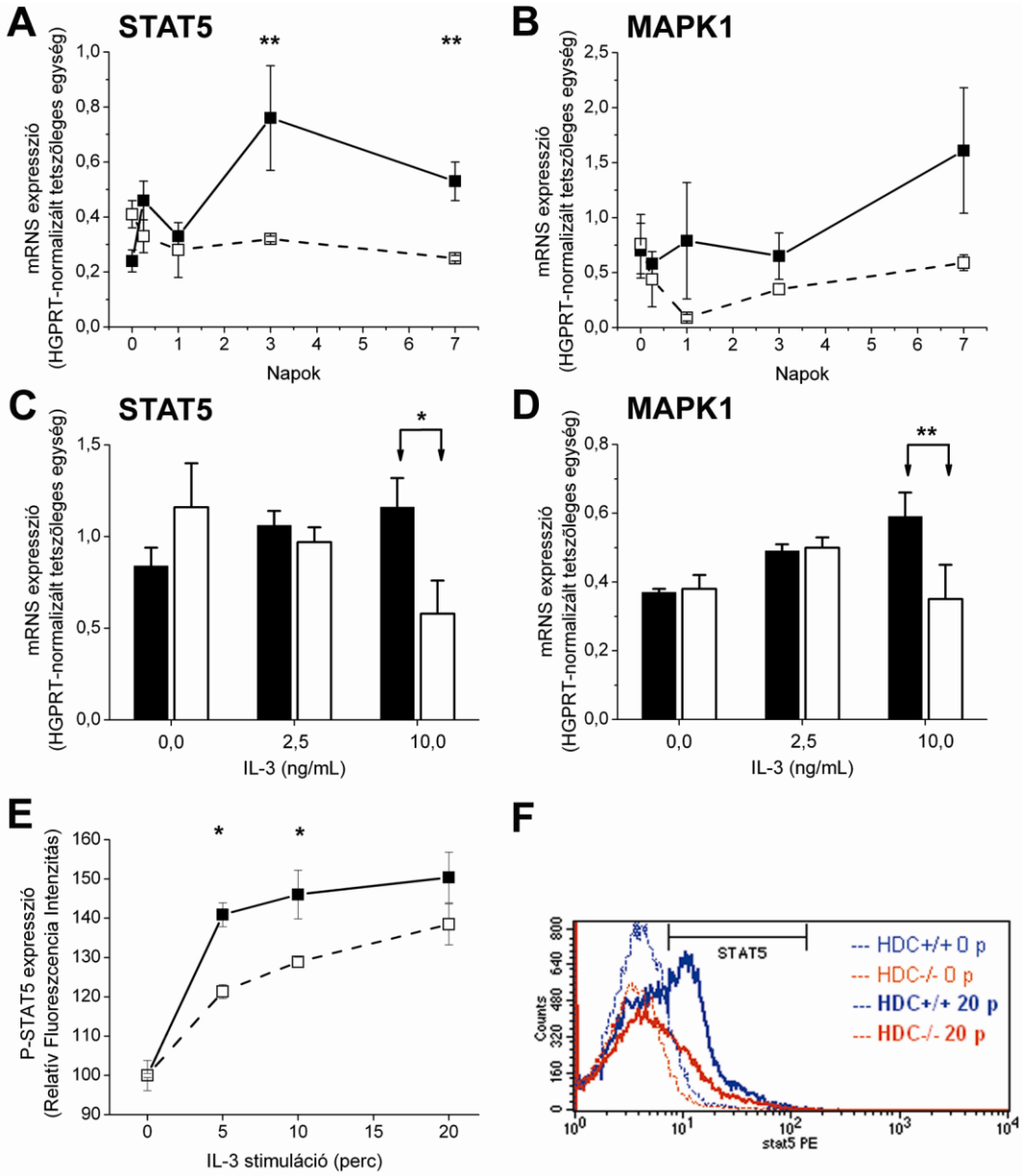
IV.3.3. HDC$^{-/-}$ egerekben elmarad a megfelelő IL-3 jelátvitel

A továbbiakban az IL-3 jelátvitel mélyére hatoltunk, és azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a hisztamin hiánya az IL-3 két útvonalának fő jelátviteli molekuláit. A 14. ábrán láthatók az eredményeink.

Elsőként a csontvelő-regeneráció során néztük meg a STAT5 és a MAPK1 mRNS expresszióját, és hasonlítottuk össze a HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerek eredményeit (14.A-B ábra). A besugárzást követő 3. és 7. napra a hisztaminhiányos egerek csontvelői sejtjeinek STAT5 termelése jelentősen elmaradt a vad típusúhoz képest. A MAPK1 esetében az eltérések nem voltak ennyire egyértelműek.

A korábbiakban kifejtett, IL-3 által stimulált HDC$^{-/-}$ csontvelői tenyészetekben észlelt csökkent osztódási és DNS-szintetizálási arány hátterében szintén felvetődött az IL-3 jelátvitel zavara. Ennek megfelelően meghatároztuk a STAT5 és a MAPK1 mRNS expresszióját az IL-3-mal kezelt sejtekben. A 14.C-D ábra mutatja, hogy a nagyobb (10ng/ml) IL-3 koncentrációnál mind a két jelátviteli molekulában szignifikáns különbséget találtunk a hisztaminhiányos és a vad típusú sejtek között.

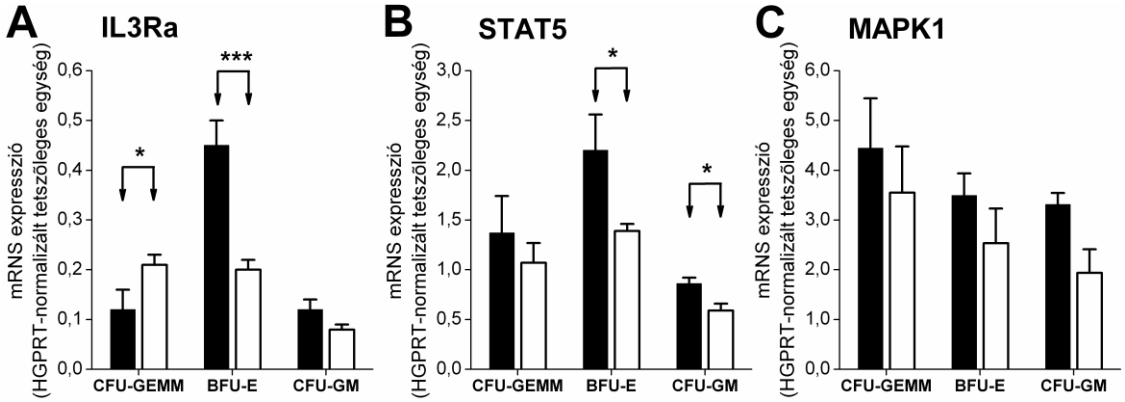
A következő kísérletben tanulmányoztuk a csontvelői limfocita-blaszt sejtek STAT5 aktivációjának kinetikáját és mértékét. Röviden összefoglalva, $HDC^{-/-}$ és $HDC^{+/+}$ egerek csontvelői sejtjeit stimuláltuk 100mg/ml IL-3-mal 0, 5,10 és 20 percig, majd a foszforilált STAT5 (P-STAT5) intracelluláris mennyiségét mértük flow citometriás módszerrel (14.E-F ábra). A nem stimulált kontroll mintákban nem találtunk különbséget a két csoport között. Érdekes módon mind *in vivo*, mind *in vitro* a STAT5 génexpressziós szintje kissé magasabb volt a hisztaminmentes egerekben ($p<0.1$; 14.A és C ábra), ami azt jelentheti, hogy a hisztamin hiánya negatívan befolyásolja a nyugalmi foszforilációs aktivitást. Az IL-3 stimulációt követő analízis eredeménye szerint a $HDC^{-/-}$ sejtek STAT5 aktivációja eltérő kinetikát mutatott: a csúcsaktiváció később jelentkezett, a maximumot a stimulációt követő 20 perc múlva érte el. A vad típusú sejtekben azonban már az 5. percben jelentős foszforiláció zajlott, ami nem is csökkent a továbbiakban sem a kísérletünk alatt. Meg kell említenünk azonban, hogy a P-STAT5 alacsonyabb szintje ellenére, a P-STAT5 pozitív sejtek aránya az 5. percben a $HDC^{-/-}$ mintákban nagyobb mértékű (több mint 9-szeres) növekedést mutatott a $HDC^{+/+}$ egerekének 6-szoros növekedéséhez képest ($p<0.05$). Ennek oka valamiféle kompenzációs mechanizmusban keresendő, amely pótolja az elégtelen foszforilációs aktivitást a hisztaminhiányos sejtekben. Mindenesetre az IL-3 stimulációt követő 20. percre ez a különbség kiegyenlítődött, azaz a vad típusú csontvelő is nagyobb arányban toborzott IL-3-ra szenzitív és reagáló sejteket. Ez, és a STAT5 molekulák nagyobb mértékű aktivációja az IL-3 szignálok sokkal hatékonyabb közvetítését jelentik a hisztamin jelenlétében.



14. ÁBRA: A fő IL-3 jelátviteli molekulák összehasonlítása HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (□) egerekben. A-*B)* *A STAT5 és a MAPK1 mRNS expressziójának alakulása a csontvelő-regeneráció alatt, 4 Gy egésztest-besugárzást követően, a 6. órában, 1., 3. és 7. napon, real-time PCR-rel mérve (n=6).* ***C-D)*** *2x10^6 csontvelői sejt/lyuk denzitásban kiültettünk sejteket, és növekvő dózisú IL-3-mal kezeltük meg őket. 28 óra múlva real-time PCR-t végeztünk (n=4, 3 párhuzamos méréssel).* ***E-F)*** *A foszforilált STAT5 flow citometriás analízise a limfocita-blaszt kapu sejtjeiben, 100ng/ml IL-3 stimulációt követően 0, 5, 10 és 20 perccel (n=4). A statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros (csontvelő-regenerációs modellben) és kétfaktoros ismétléses (IL-3-kezelések) varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05, (**) p<0.01. Adatpontok: átlag ± SEM. A kísérleteket kétszer ismételtük.*

IV.3.4. Az IL-3 jelátvitelben tapasztalt különbségek a kolóniaformáló egységekben is megmutatkoznak

Végezetül szerettük volna megvizsgálni, hogy ezek a jelátvitelben tapasztalt eltérések vajon már a hematopoietikus őssejtekben is jelen vannak-e. Ezért meghatároztuk az IL3Ra, a STAT5 és a MAPK1 mRNS expresszióját a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek CFU assay során tenyésztett CFU-GEMM, BFU-E és CFU-GM kolóniáiban. A 15. ábrán látható, hogy hisztamin hiányában az eritroid (BFU-E) és a mieloid (CFU-GM) kolóniák szignifikánsan alacsonyabb IL3Ra és STAT5 mRNS expressziót mutattak. Míg a pluripotens CFU-GEMM sejtek STAT5 génexpressziójában nem volt különbség, addig az IL3Ra expresszió nagyobb volt a $HDC^{-/-}$ sejtekben. Ami a MAPK1-et illeti, nem találtunk szignifikáns különbségeket a két egércsoport között, bár a BFU-E és a CFU-GM kolóniák hasonló tendenciát mutattak, mint a másik két moleula esetén. Összességében ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a hisztamin befolyásolja az IL-3 jelátviteli útvonalait, és ez a hatás már az őssejtek szintjén érvényesül.



15. ÁBRA: Csontvelői kolóniaképző progenitorok IL-3 jelátviteli molekuláinak összehasonlítása $HDC^{+/+}$ (■) és $HDC^{-/-}$ (□) egerekben. *$2x10^4$ csontvelői mononukleáris sejtet kiültettünk metilcellulóz tartalmú táptalajba 7 ill. 13 napig. Az izolált kolóniákból mRNS-t szeparáltunk, az IL3Ra, a STAT5 és a MAPK1 mRNS expresszióját real-time PCR-rel határoztuk meg. A kísérletekhez genotípusonként 3 állatot használtunk, 3 párhuzamos méréssel, két független kísérletben ismételve. Adatpontok: átlag ± SEM. A statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros ismétléses varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05, (***) p<0.001.*

IV.4. AZ EXTRAMEDULLÁRIS VÉRKÉPZÉS VIZSGÁLATA $HDC^{+/+}$ ÉS $HDC^{-/-}$ EGEREKBEN

Az előző kísérleteinkben a csontvelői folyamatokra koncentráltunk, és ott vizsgáltuk a hematopoietikus sejtek osztódását és differenciálódását. Azonban vérképző sejtek nemcsak a csontvelőben találhatók, és a szerepük különösen fontossá válik csontvelődepresszió esetén. Ezért, hogy teljes képet nyerjünk a hisztaminmentes egerek egésztest-besugárzást követő hematopoietikus regenerációjáról, szükségesnek láttuk a lépben zajló vérképzés vizsgálatát is.

IV.4.1. A lép sejtösszetétele eltér $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerekben

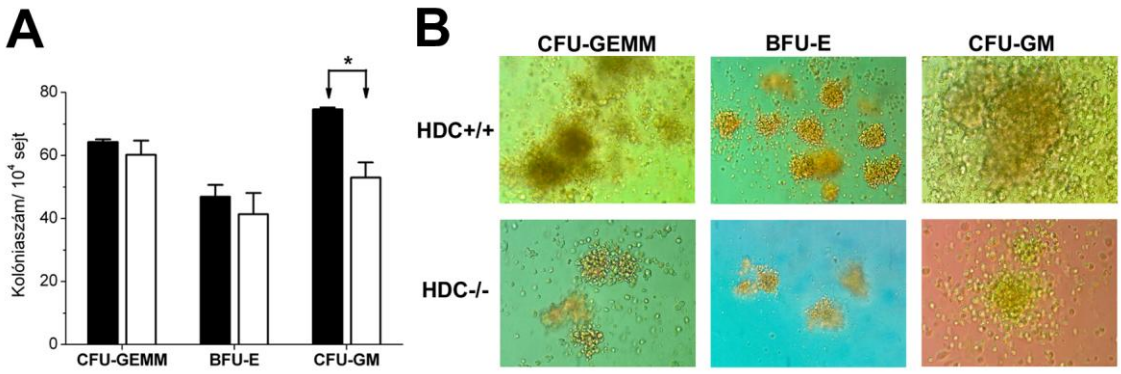
A 6. táblázat összegzi a két egértípus lépsejtszámának és sejtösszetételének mérési eredményeit. A $HDC^{-/-}$ egerek relatív lépcellularitása jelentősen alulmaradt a vad genotípuséhoz képest. Az eltérést azonban nem magyarázták a korai progenitorok és őssejtek, mivel nem találtunk különbséget a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek CD34+, Ckit+, Sca1+, STR és LTR sejtjeinek aránya között. A különbségek hátterében inkább a Th sejtek valamint a CD11b+ (mieloid) és az F4/80+ (monocita-makrofág) sejtpopulációk csökkenése állhat.

	HDC+/+	HDC-/-	szignifikancia
Lép (10*6 sejt/mg)			
Sejtszám	0,83 ± 0,03	0,67 ± 0,04	P < 0,05
FACS analízis (%)			
B sejtek (**B220**+)	48,8 ± 0,7	50,4 ± 1,7	n.sz.
Th sejtek (CD4+)	34,2 ± 1,2	29,3 ± 0,9	P < 0,01
Tc sejtek (CD8+)	12,3 ± 0,4	12,9 ± 0,6	n.sz.
CD4+/CD5+	32,2 ± 1,0	27,9 ± 1,0	P < 0,05
CD8+/CD25+	0,2 ± 0,0	0,9 ± 0,2	P < 0,01
CD25+	2,5 ± 0,1	3,2 ± 0,2	P < 0,01
Ter119+	3,5 ± 0,3	2,8 ± 0,4	n.sz.
CD11b+	6,1 ± 1,7	2,3 ± 0,4	P < 0,05
F4/80+	2,9 ± 0,3	1,3 ± 0,2	P < 0,001
Lin-	49,7 ± 4,6	45,6 ± 2,6	n.sz.
CD34+	16,2 ± 2,4	17,5 ± 3,0	n.sz.
Ckit+	23,6 ± 6,5	21,2 ± 3,8	n.sz.
Sca1+	67,9 ± 4,2	73,8 ± 5,0	n.sz.
STR	15,6 ± 2,2	20,5 ± 2,5	n.sz.
LTR	2,7 ± 0,7	4,9 ± 0,9	n.sz.

6. TÁBLÁZAT: A HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerek lépének sejtösszetétele. *A sejtszámokat hematológiai automatával mértük. A sejtpopulációk immunfenotipizálása és a limfocita-blaszt kapun belüli arányának meghatározása flow citometriás módszerrel történt. Az eredmények csoportonként n=5 adat átlagának (± SEM) felelnek meg, a méréseket 3 független kísérletben végeztük. A statisztikai szignifikanciát Student-féle t-teszttel számoltuk ki.*

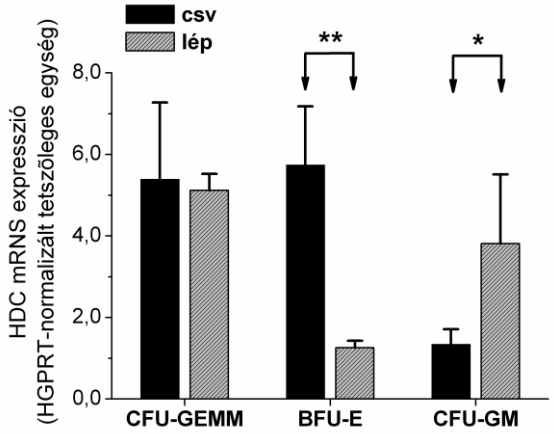
IV.4.2. A HDC$^{-/-}$ egerek lépében kevesebb a mieloid kolóniaképző őssejt

Az őssejtek arányában a kontroll egerek lépében ugyan nem találtunk különbséget, de mi kíváncsak voltunk arra, hogy vajon a funkciójukat ellátni képes őssejtek száma is azonos-e hisztamin mellett és hiányában. Ennek érdekében CFU-assay-t végeztünk a lépsejteken. A 16.A ábrán láthatók a leszámolt kolóniák adatai a HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerekben. A csontvelői eredményektől eltérő módon a lépben csak a granulocita-makrofág (CFU-GM) kolóniák számában találtunk szignifikáns (29.0 ± 9.0%-os) csökkenést a hisztamin hiányában. Hasonlóan a csontvelőben detektáltakhoz, a HDC$^{-/-}$ kolóniák mérete ebben az esetben is kisebb volt, mint a vad típusúak (16.B ábra).



16. ÁBRA: HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (□) egerek léperedetű korai vérképző progenitorainak *in vitro* kolóniaképző képessége. ***A)*** *A multilineage (CFU-GEMM, CFU-GM) és eritroid (BFU-E) progenitor kolóniák száma, 10^4 kiültetett sejtre vonatkoztatva.* ***B)*** *A kétféle egér kolóniáinak típusos megjelenése 7 nap (BFU-E) illetve 13 nap (CFU-GEMM, CFU-GM) inkubációt követően, 150-szeres nagyítással. A kísérletekhez genotípusonként 3 állatot használtunk, 3 párhuzamos méréssel, két független kísérletben ismételve. Adatpontok: átlag ± SEM. A statisztikai szignifikanciát a Student-féle t-teszttel határoztuk meg; (*) p<0.05.*

A következőkben összevetettük a lépből és a csontvelőből eredő normál genotípusú kolóniák HDC expresszióját (17. ábra). A csontvelőben a mieloid kolóniák HDC-tartalma volt a legkisebb, és ez összefüggött azzal, hogy ezeknek a kolóniáknak a számában nem találtunk különbséget a HDC$^{+/+}$ és a HDC$^{-/-}$ egerek között. Ezzel szemben a lépben - a CFU-GM-számokban észlelt eltéréssel összefüggésben - a mieloid populációban mértünk jelentősen nagyobb expressziót a csontvelőhöz képest, jelezvén, hogy a lépben a hisztaminnak nagyobb szerepe lehet a mieloid sejtvonalban, mint a csontvelőben. Az eritroid vonalban éppen az ellenkezőt tapasztaltuk.



17. ÁBRA: HDC$^{+/+}$ egerek csontvelői és léperedetű kolóniáinak HDC mRNS expressziója. *A HDC$^{+/+}$ egerek izolált kolóniáiból mRNS-t szeparáltunk, majd real-time PCR-t végeztünk. A statisztikai szignifikanciát kétfaktoros ismétléses varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05, (**) p<0.01.*

IV.4.3. Az extramedulláris vérképzés eltérő módon szabályozódik a hisztaminhiányos egerekben

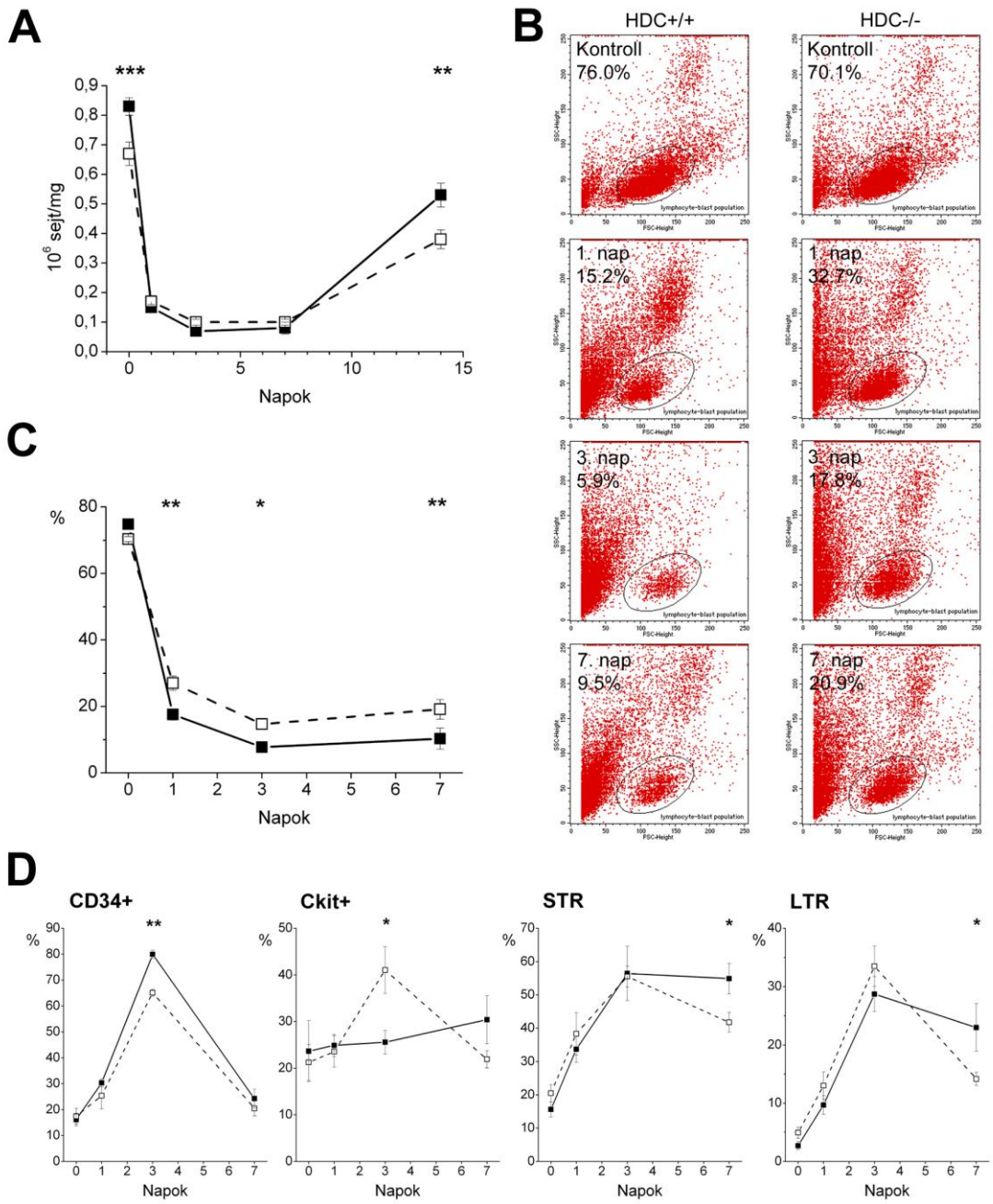
Minekután tapasztaltuk, hogy a lép vérképző sejtjeiben is található némi eltérés, ezért extramedulláris vérképzésre serkentettük a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egereket, hogy megvizsgáljuk, stresszhatás alatt vajon hogyan viselkednek ezek az őssejtek. Az *in vivo* besugárzásos modellt alkalmaztuk ezekhez a vizsgálatokhoz, amelyeket a csontvelői analízishez hasonló módon értékeltünk.

A 18.A ábra mutatja a besugárzás hatását a lépsejtszámokra. A csontvelőhöz hasonlóan a lépsejtszámok is jelentősen zuhannak a besugárzást követően, a mélypontot itt is a 3. napon érik el. Érdekes módon a vad genotípusú egerek lépsejtszáma nagyobb mértékben csökken (8.3 ± 0.7% a kontroll adatokhoz képest), mint a hisztaminhiányos egereké (14.4 ± 1.2%, $p<0.01$). A 14. napra azonban a $HDC^{+/+}$ egerek lépcellularitása csaknem 8-szoros növekedést mutatott, míg a $HDC^{-/-}$ egereké mindössze 4-szeresen emelkedett a harmadik napi sejtszámokhoz képest, így szignifikánsan alulmaradt a vad típusúhoz képest.

A 18.B-C ábra demonstrálja a limfocita-blaszt kapu változásait, amik magyarázhatják a hisztaminmentes egerek relatíve magasabb lépsejtszámait a besugárzást követő korai fázisban. Míg a hisztaminmentes limfocita-blaszt populáció aránya a kezdeti csökkenést követően a kontroll 27.2 ± 4.2%-ára emelkedett a 7. napon, addig a vad típusú sejtek továbbra is jelentősen alacsonyabb arányt képviseltek (13.8 ± 4.2%).

Meglepő módon a vizsgált őssejt-populációk nem szolgáltak magyarázattal ezekre a korai eltérésekre (18.D ábra). Csak a Ckit+ sejtek mutattak szignifikáns növekedést a $HDC^{-/-}$ egerekben a 3. napon. Ez azt sugallja, hogy a limfocita-blaszt arány relatív növekedéséért valamely más populáció tehető felelőssé, valószínűleg az elkötelezett (érett) sejtek közül.

Mindazonáltal a hisztaminmentes CD34+ sejtek aránya jelentősen elmaradt a vad típustól a 3. napon csakúgy, mint az STR és LTR populációk aránya a 7. napon. Ezen eredmények viszont alátámasztják a lépsejtszámok regenerációjában a 14. napon észlelt késést a hisztamin hiányában.



<u>18. ÁBRA:</u> A sejtpopulációk alakulása HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (□) egerek lépében, 4 Gy egésztest-besugárzást követően, az 1., 3., 7. és 14. napon. ***A)*** *A relatív lépcellularitás alakulása.* ***B)*** *A lép sejtjeit 4-színű flow citometriás módszerrel analizáltuk. Az ábrán reprezentatív dot plot ábrák láthatók, ahol a limfocita-blaszt populációt kikapuztuk, és arányukat a lépben tüntettük fel.* ***C)*** *A limfocita-blasztsejtek aránya a lépben.* ***D)*** *A regenerálódó progenitorsejtek kinetikája. A CD34+ és a Ckit+ sejtek arányát a limfocita-blaszt kapun belül, az STR és az LTR sejtek arányát a Lin-/CD34+ ill. Lin-/CD34- kapun belül határoztuk meg. Az adatpontok az ábrákon n=5 adat átlagának ± SEM felelnek meg, a statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001.*

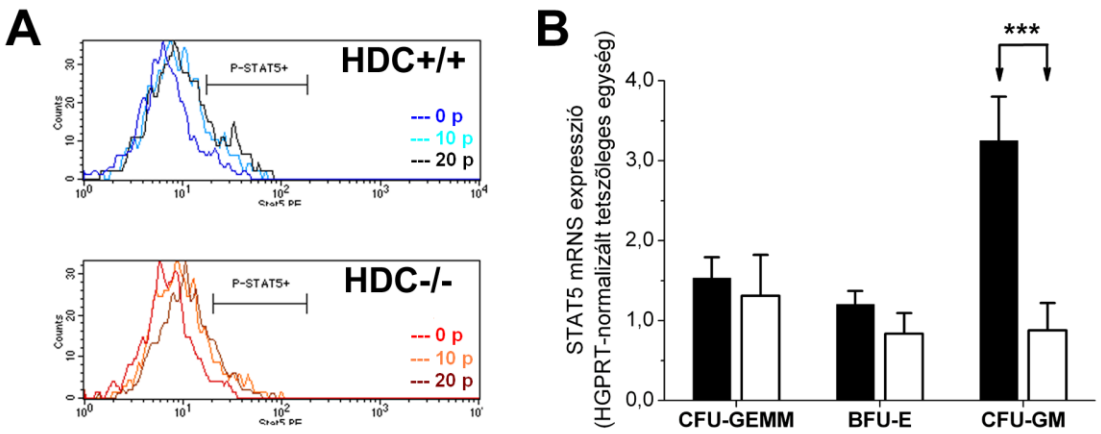
IV.4.4. Hisztamin hiányában a lépsejtek IL-3 jelátvitelében is eltérések mutatkoznak

Az IL-3 lépsejtekre gyakorolt hatásait is összehasonlítottuk a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerekben. Érdekes módon, az MTT assay és a sejtciklus-analízis alapján nem találtunk különbséget a lépsejtek osztódásában és sejtciklusbeli állapotában, a hisztamin hiányában (az adatokat nem tüntettük fel).

A következőkben tanulmányoztuk a STAT5 aktivációját a lép limfocita-blaszt sejtjeiben a már korábban kifejtett flow citometriás módszerrel (19.A ábra). Nem volt különbség a kezeletlen vad típusú és a hisztaminmentes sejtek P-STAT5 tartalmában (az RFI értékek a $HDC^{+/+}$ esetén 24.8 ± 0.3, a $HDC^{-/-}$ esetén 25.9 ± 1.2 voltak). Különbség mutatkozott azonban az IL-3 stimulációt követő STAT5 aktiváció kinetikájában: a hisztaminhiányos sejtekben a STAT5 csúcsaktivációja hamarabb jelentkezett, már a 10. percben (az RFI érték ekkor 29.6 ± 0.6 volt, a $HDC^{+/+}$ egerek 27.8 ± 0.04 értékéhez képest, $p<0.001$), azonban ezt követően a normál szintre visszaesett. A vad genotípusú sejtekben azonban az aktiváció a maximumát 20 perccel a stimuláció után éri el, az RFI érték ekkor 29.0 ± 0.7 volt a hisztaminmentes sejtek 26.7 ± 0.6 értékéhez képest ($p<0.05$).

A mieloid populációban hasonló eredményeket kaptunk, azonban nem találtunk eltérést a különböző progenitor szubpopulációk (a CD34+, Ckit+, Sca1+, STR és LTR sejtek) P-STAT5 tartalmában a két egércsoport között.

Végül összehasonlítottuk a $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek lépéből származó kolóniák STAT5 mRNS expresszióját. A 19.B ábrán látható, hogy a hisztamin hiányában a mieloid (CFU-GM) kolóniák STAT5 expressziója szignifikánsan (csaknem 75%-kal) alacsonyabbnak bizonyult.



<u>19. ÁBRA:</u> Az IL-3 jelátvitelének összehasonlítása HDC$^{+/+}$ és HDC$^{-/-}$ egerek lépében. ***A)*** *A foszforilált STAT5 flow citometriás analízise a limfocita-blaszt kapu sejtjeiben, 100ng/ml IL-3 stimulációt követően 0, 5, 10 és 20 perccel. Az ábrán reprezentatív hisztogrammokat tüntettünk fel (n=4).* ***B)*** *A léperedetű kolóniaképző progenitorok STAT5 mRNS expressziójának összehasonlítása HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (□) egerekben, real-time PCR-rel. A kísérlethez genotípusonként 3 állatot használtunk, 3 párhuzamos méréssel, két független kísérletben ismételve. Adatpontok: átlag ± SEM. A statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros ismétléses varianciaanalízissel határoztuk meg; (***) p<0.001.*

IV.4.5. A HDC$^{-/-}$ egerek lépéből nyert dendritikus sejtek hatékonyabb immunreakciót mutatnak

A lép, mint az antigénbemutatás és az immunsejtek érésének fő színtere, egy állandóan aktív immunológiai környezetet jelent az ott lévő immun- és egyéb sejtek számára. Kísérleteinkkel kapcsolatban felvetődött a kérdés, hogy vajon mennyiben változik meg ez az immunológiai környezet hisztamin hiányában, ami azután nyilvánvalóan befolyásolhatja az őssejtek és progenitorok érését is.

Ehhez munkacsoportunk a hisztaminmentes és a vad genotípusú egerek lépéből izolált dendritikus sejteket, majd *in vitro* antigénprezentációs assay-vel összehasonlította az antigénbemutatási képességüket. Eredményeink szerint a HDC$^{-/-}$ dendritikus sejtek hatékonyabbnak bizonyultak az antigénbemutatásban. Ezután az immunstimulációra bekövetkező citokintermelésüket hasonlítottuk össze *in vitro* LPS-, illetve *in vivo* CFA-stimulációt követően real-time PCR-rel illetve ELISA módszerrel. Azt tapasztaltuk, hogy aktivációt követően jelentősen megemelkedett a Th_1 típusú IL-12p35 és IFNγ termelődése a hisztaminhiányos sejtekben, míg a Th_2 típusú IL-10 termelődése csökkent (az adatokat nem mutatjuk be). Mindez hatékonyabb immunválaszt eredményez a hisztaminmentes környezetben.

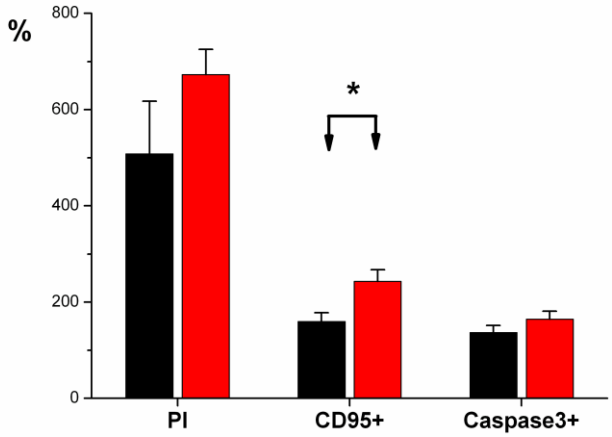
IV.5. $HDC^{+/+}$ ÉS $HDC^{-/-}$ EGEREK VÉRKÉPZŐ SEJTJEINEK APOPTÓZIS-VIZSGÁLATA

Az eddigiekben a hisztaminnak a vérképző ős- és progenitorsejtek osztódására gyakorolt hatását vizsgáltuk. A sejtek sorsának kimenetele bizonyos behatást követően azonban a proliferáción és differenciálódáson kívül a sejtpusztulás is lehet. Ezért tartottuk szükségesnek megvizsgálni az apoptózis specifikus folyamatait hisztamin hiányában.

IV.5.1. A $HDC^{-/-}$ egerek csontvelői sejtjei fokozott apoptóziskészséget mutatnak egésztest-besugárzást követően

Elsőként az *in vivo* 4 Gy dózisú besugárzást követő apoptotikus mechanizmusokat vizsgáltuk meg, az expozíció után 2, 6 és 24 órával $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek csontvelői sejtjeiben. Besugárzást követően 6 órával már jelentősen lecsökkent a limfocita-blaszt populáció aránya a hisztaminhiányos egerek mintáiban, ebben az időpontban láttuk a legjelentősebb eltéréseket is az apoptotikus markerekben. A fokozott sejtpusztulást igazoltuk a PI-os festéssel, az eredmények, bár nem szignifikánsak, de több kísérletben is konzekvensen reprodukálhatóak voltak. A folyamat hátterében főleg a CD95+ sejtek arányának szignifikáns növekedését tapasztaltuk a $HDC^{-/-}$ egerekben (20. ábra).

A besugarazatlan, kontroll csoportok apoptózisában nem találtunk kimutatható különbséget $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek között.



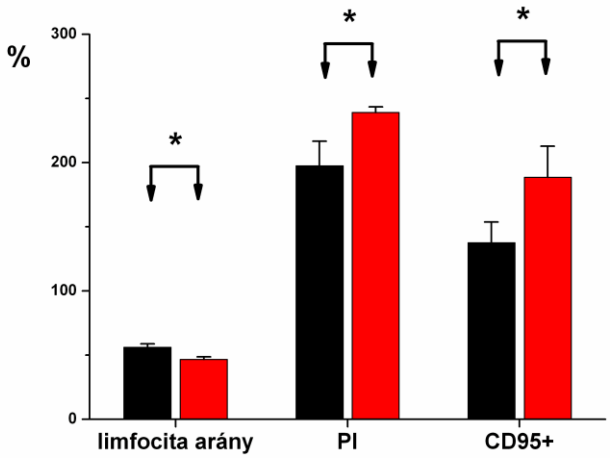
20. ÁBRA: Apoptotikus markerek összehasonlítása a HDC$^{+/+}$ (■) és HDC$^{-/-}$ (■) egerek csontvelői sejtjeiben, az *in vivo* 4 Gy besugárzást követő 6. órában. *A méréseket flow citometriás módszerrel végeztük, az ábrán az apoptotikus markerek változását a kezeletlen kontroll %-ában, a limfocita-blaszt populációra vonatkoztatva tüntettük fel. Az adatpontok n=6 adat átlagának ± SEM felelnek meg, a kísérletet 3-szor ismételtük; a statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05.*

Itt kell megjegyeznünk, de a megállapítás érvényes az *in vitro* kísérletekre is, hogy megvizsgáltuk az apoptózis markereit (a CD95, a CD95L és az intracelluláris kaszpáz-3 expresszióját) a különböző őssejt-populációkban is, azonban érdekes módon nem kaptunk olyan egyértelmű különbségeket a vad típusú és a hisztaminhiányos egerek sejtjei között, mint amit a teljes limfocita-blaszt kapuban tapasztaltunk. Egyik oka lehet ennek az őssejtek fokozott érzékenységéből fakadó technikai hiba. Másrészről viszont a limfocita-blaszt kapuban látott eltérés hátterében leginkább a HDC$^{-/-}$ egerek egyes T-sejt populációiban (különösen a CD3+ és a CD3+/CD25+ sejtekben) észlelt megnövekedett marker- (főleg CD95) expresszió állhat.

IV.5.2. *In vitro* besugárzás hatására a hisztaminhiányos sejteknek fokozódik a sejtpusztulása

Azért, hogy kizárjuk az *in vivo* besugárzást követő szisztémás gyulladásos folyamatokkal együttjáró fokozott intercelluláris és immunológiai folyamatok apoptózist befolyásoló hatásait, vizsgálatainkat megismételtük a csontvelői sejtek *in vitro* 4 Gy dózisú besugárzása után. Méréseinket a besugárzást követően 6 órával

végeztük. A 21. ábra mutatja, hogy a $HDC^{-/-}$ mintákban a limfocita-blaszt populáció aránya nagyobb mértékben csökkent a besugárzás után a vad genotípushoz képest, amivel korrelál az elpusztult (PI+ sejtek) arányának emelkedettsége. Eredményeink alapján továbbá levonhatjuk, hogy *in vitro* nagyobb mértékű és szignifikáns különbségeket tapasztaltunk az apoptotikus markerekben, főleg a DNS fragmentáció mértékében (PI festés alapján), valamint a CD95+ sejtek arányában. Ezek mind a hisztaminhiányos sejtek fokozott apoptóziskészségét támasztják alá, mely a sejtek intrinsic jellemzője.

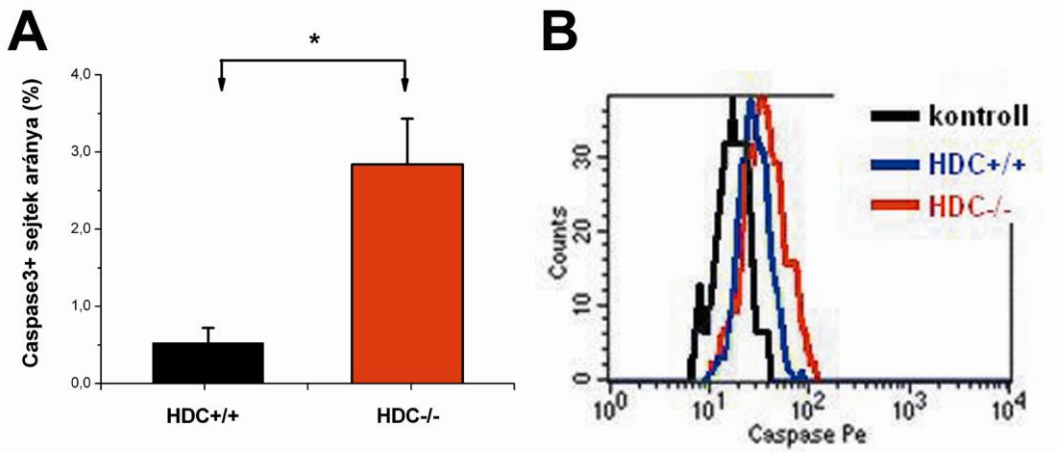


<u>21. ÁBRA:</u> Apoptotikus markerek összehasonlítása a $HDC^{+/+}$ (■) és $HDC^{-/-}$ (■) egerek csontvelői sejtjeiben, *in vitro* 4 Gy dózisú besugárzást követően 6. órával. *A méréseket flow citometriás módszerrel végeztük, az ábrán a limfocita-blaszt populáció arányát a teljes csontvelőre, az apoptotikus markerek értékeit a limfocita-blaszt populációra vonatkoztatva, a kezeletlen kontroll %-ában tüntettük fel. Az adatpontok n=5 adat átlagának ± SEM felelnek meg, két párhuzamos méréssel; a statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) $p<0.05$.*

IV.5.3. *In vitro* etopozid-indukcióra megnő a $HDC^{-/-}$ sejtek kaszpáz-3 expressziója

A besugárzáson kívül számos fizikai behatás, citotoxikus anyag, és egyéb immunológiai folyamat indíthatja be az apoptózis mechanizmusait. Kísérleteinkben egy szemiszintetikus citosztatikumot, etopozidot alkalmaztuk apoptózisinduktorként, hogy megvizsgáljuk, vajon más behatásra is hasonlóan, fokozott apoptózissal reagálnak-e a hisztaminhiányos sejtek. Az etopozid támadási pontja a topoizomeráz II enzim, melynek aktivitását felfüggesztve lánctöréseket hoz létre a DNS-ben. Eredményeink ebben a

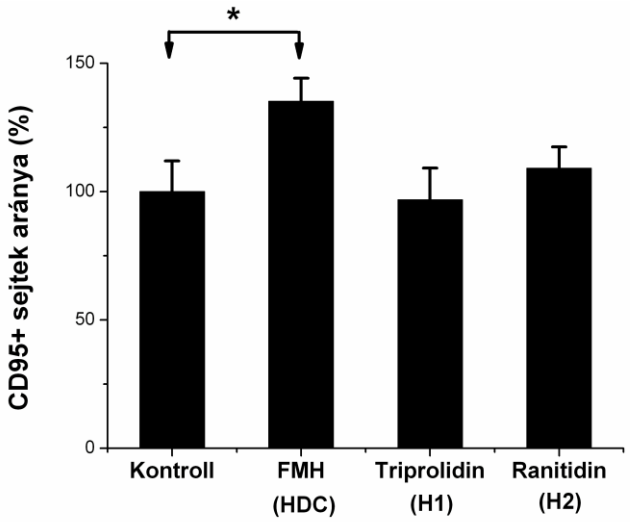
kísérletben megintcsak igazolták a $HDC^{-/-}$ sejtek fokozott apoptózisát. Ez itt legmarkánsabban a kaszpáz3+ sejtek megnövekedett arányában látszott (22. ábra).



22. ÁBRA: Intracelluláris kaszpáz-3 expressziójának összehasonlítása a $HDC^{+/+}$ (■) és $HDC^{-/-}$ (■) egerek csontvelői sejtjeiben, *in vitro* etopozidkezelést követően 4 órával. *A méréseket flow citometriás módszerrel végeztük, az ábrán a limfocita-blaszt sejtek eredményeit tüntettük fel. Az adatpontok n=4 adat átlagának ± SEM felelnek meg, két párhuzamos méréssel, a kísérletet kétszer ismételtük; a statisztikai szignifikanciát a két csoport között kétfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) $p<0.05$.*

IV.5.4. Vad genotípusú csontvelői sejtek apoptózisa fokozódik a hisztamintermelés *in vitro* gátlása mellett

A következőkben azt kívántuk megvizsgálni, hogy a hisztamin szintézisének vagy a hatásainak külső gátlásával előidézhető-e a fokozott apoptózis a vad genotípusú sejtekben. Ehhez FMH-val irreverzibilisen gátoltuk a HDC enzim működését, valamint H1R-blokkoló triprolidint illetve H2R-blokkoló ranitidint alkalmaztunk, majd 4 órán át etopoziddal inkubáltuk a sejteket. A 23. ábrán látható, hogy a sejtekben csak a szintézis gátlása okozott megnövekedett CD95 expressziót, a felszíni receptorok gátlása nem. Ez az eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy a hisztamin hatása a receptorok blokkolása esetén más mechanizmusokon vagy más receptorokon (például a H4R-on) keresztül is érvényesülhet.



23. ÁBRA: HDC$^{+/+}$ egerek csontvelősejtjeinek CD95 expressziójának alakulása *in vitro* etopozidkezelést követően, a hisztamin szintézisének illetve a receptorainak gátlására. *A hisztamin szintézisét FMH-val (10^{-4} M), a H1R-t Triprolidinnel (10^{-5} M), a H2R-t Ranitidinnel (10^{-5} M) blokkoltuk 24 óráig, majd etopozidot (10^{-6} M) adtunk a sejtekhez 4 órán át. A méréseket flow citometriás módszerrel végeztük, az ábrán a limfocita-blaszt sejtek eredményeit tüntettük fel. Az adatpontok n=4 adat átlagának ± SEM felelnek meg, két párhuzamos méréssel, a kísérletet kétszer ismételtük; a statisztikai szignifikanciát egyfaktoros varianciaanalízissel határoztuk meg; (*) p<0.05.*

Meg kell említeni, hogy természetesen elvégeztük a kísérletet fordítva is, azaz a HDC$^{-/-}$ egereknek illetve sejteknek külsőleg adagoltunk hisztamint, és így vizsgáltuk az apoptotikus markereket *in vivo* és *in vitro*. Eredményeink azt igazolták, hogy az exogén hisztaminpótlás csak kismértékben csökkentette az apoptózis iránti hajlamot a genetikailag hisztaminhiányos sejtekben.

V. Megbeszélés

A vérképzés igen összetett rendszer, melyet számos érett és éretlen sejttípus, az őket jellemző élettani folyamatok, valamint az ezeket szabályozó intercelluláris kapcsolatok és szolubilis faktorok, citokinek hálózata alkot. A vérképzés valamennyi sejtvonala egy közös előalakból, a hematopoietikus őssejtből fejlődik ki, melynek jellemző funkciói az önmegújító képesség, az osztódás és a differenciálódás. Az utóbbi időben egyre több adat gyűlt össze a vérképző ős- és progenitorsejtek immunfenotípusát és élettanát illetően, melyek által pontosabban tudjuk jellemezni a különböző típusú őssejteket.

Jelen tanulmányunkban ebbe a bonyolult, rendkívül sokféle sejttípust, sejtélettani folyamatot és szabályozó mechanizmust felvonultató, dinamikus rendszerbe próbálunk betekintést nyújtani, és valamelyest tisztázni a hisztaminnak a vérképzésben betöltött szerepét. A hisztamin széles körben expresszálódó mediátor, amely számos élettani és kórélettani folyamatban játszik szerepet. Azonban, míg korábban csak az allergiás-gyulladásos immunológiai mechanizmusokkal hozták kapcsolatba, addig az újonnan felfedezett funkciói újabb sejtélettani hatásokat is feltételeznek. Ezek közé tartozik a vérképzés is. A hisztamin kétségtelenül befolyásolja a vérképzés és az immunrendszer sejtjeinek élettani folyamatait[132,136]. Mégis a szakirodalomban továbbra is vita van a hisztaminnak a hematopoietikus kompartmentben betöltött valós szerepét illetően, mivel többen úgy vélik, hogy alapvetően és általánosságban a vérképzés folyamatára nincs számottevő hatása[136,225]. Ugyanakkor számos adat szól amellett, és ezt a fent idézett munkacsoportok is igazolták és elismerik, hogy a hisztamin a csontvelői sejtek, különösen bizonyos sejtvonalak prekurzor sejtjeinek osztódását és differenciálódását elősegíti[176-177,182,184,190]. Sőt, ezek a sejtek maguk is termelik a HDC enzimet, és ezáltal képesek a hisztamin termelésére bizonyos behatásokat követően[141,177,180]. Új génexpressziós profil vizsgálatokban kimutatták, hogy nem csak a mieloid vonal sejtjei expresszálják a HDC-t, hanem a legkoraibb vérképző őssejtek is[35,81,193-194].

Mivel ezeket az adatokat többnyire *in vitro* kísérletekből vonták le, mindenképpen szükséges volt egy olyan *in vivo* rendszer alkalmazása, amely lehetőséget ad e vitatott

kérdéskör pontosabb tisztázására. Erre nyújtott megoldást a génkiütött egérmodellünk, melyben a HDC enzim genetikai módosítás eredményeként teljesen működésképtelen állapotban van, így ezek az egerek nem termelnek hisztamint, a táplálék útján történő hisztaminfelvétel akadályozásával (hisztaminmentes diéta alkalmazásával) ráadásul teljességgel hisztaminmentesé tehetők. Így kiváló modellrendszert képeznek a hisztamin hatásainak *in vivo* vizsgálatához. Mindazonáltal, tekintettel az *in vivo* csontvelői rendszer komplexitására, kísérleteinket *in vitro* módszerekkel is kiegészítettük. Kérdéseinket próbáltuk több oldalról is megvizsgálni annak érdekében, hogy még pontosabb válaszokat kaphassunk. A dolgozatban használt kísérleti módszerek magukba foglalnak számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálatot, több funkcionális assayt, mRNS és fehérje szintű analízist. Természetesen nem minden esetben sikerült egyértelműen tisztázni a kérdéseket, több pont maradt még megválaszolatlan, illetve igényel további vizsgálatot.

1. A hisztamin szerepe az ős- és progenitorsejtek élettani funkcióiban

Kísérleteink során először is a hisztaminnak a csontvelői őssejtek proliferációs képességeire gyakorolt hatására koncentráltunk. Kimutattuk, hogy hisztamin hiányában a csontvelő-regeneráció késlekedik, aminek hátterében a hematopoietikus őssejtek csökkent proliferációja áll. Mindazonáltal igazoltuk, hogy általánosságban véve, a hisztaminhiányos egerek nyugalmi vérképzése valójában nem különbözik a vad genotípustól. Ugyanakkor, bár a perifériás érett vérsejtek száma normálisnak bizonyult, a $HDC^{-/-}$ egerek csontvelői sejtösszetételében már eltérések mutatkoztak. Hisztamin hiányában az őssejtek, nevezetesen a CD34+, STR és LTR sejtek kisebb arányt képviseltek a vad típusú csontvelőhöz képest. Ezzel párhuzamosan a funkcionálisan regenerációra képes kolónia-formáló egységek száma is lecsökkent, leginkább azokban a kolóniákban, amelyekben a HDC expresszió eredetileg a vad genotípusban a legnagyobb volt, azaz az eritroid BFU-E és a közös CFU-GEMM kolóniákban. Ez jelzi, hogy a hisztamin alapvetően szükséges a közös eritroid-mieloid progenitor sejt szintjén.

A hisztaminhiányos egerek progenitorszámában tapasztalt csökkenés az egyes kolóniák sejtjeinek számbeli csökkenésével járt együtt. Ez a csökkenés valószínűleg abból fakad, hogy az őssejtek kevésbé képesek megfelelően osztódni, illetve kevésbé

képesek a túlélésre. Ezt az elméletet bizonyítottuk a poliferációs vizsgálatainkkal. A hisztaminmentes sejtek elégtelen osztódási képességet mutattak IL-3 stimulációt követően, annak ellenére, hogy a kezeletlen állapotban a sejtek ciklusbeli állapota nem különbözött a vad genotípusú sejtekétől. Ezzel tehát igazoltuk, hogy a hisztamin főként az őssejtek osztódását befolyásolja.

Ezek a hatások mindazonáltal reverzibilisek: a dolgozatban bemutatott hisztaminmentes egerekkel és sejtekkel végzett kísérleteinket kiegészítettük olyan vizsgálati csoportokkal, amelyekben a hisztamint pótoltuk az állatoknak illetve a sejteknek. Ezekben a csoportokban a vizsgálati eredmények megközelítették a vad genotípusú állatok adatait, tehát a hisztamin exogén visszaadására rendeződnek az élettani viszonyok.

Az ős- és progenitorsejt-deficienciák bizonyos vonatkozásai rejtve maradhatnak a nyugalmi vérképzés során. Számos publikáció számol be hasonló megfigyelésekről, például a TPO-, a metalloproteináz-9-, a Ckit receptor-, a STAT5-, és az IL3R-deficiens egerek esetében[44,47-48,63,68,74,226]. Hematopoietikus stressz indukálásával, a nyugalmi helyzet megzavarásával azonban olyan hibák is a felszínre kerülhetnek, amelyek a normál állapotban nem nyilvánvalóak. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy teljestest-besugárzást követően a $HDC^{-/-}$ egerek csontvelő-regenerációja elmarad a vad genotípusú egerekéhez képest. A Lin-, a CD34+, a Ckit+, a STR és a LTR sejtek arányában láttunk eltérést, amelyek felelőssé tehetők ezért a késlekedésért a regenerációban, noha eltérő kinetikát mutattak. Eredményeinkből levontuk, hogy a hisztamin hiánya főleg a Ckit+ és az LTR sejtek repopulatív hatását befolyásolja, míg az STR és CD34+ sejtek csak a besugárzást követő korai fázisban érintettek. Az LTR sejtarány nem csökkent jelentős mértékben a sugárzásra, amit az magyaráz, hogy ezek a sejtek viszonylag sugárrezisztensek, mivel többnyire G_0 fázisban vannak, és a sugárhatás utáni 1-2 nap elteltével lépnek be aktívan a sejtciklusba[15,90,92,227]. A hisztamin hatását az LTR sejtekben tehát a 3. és a 7. nap között észleltük, amikor is a $HDC^{-/-}$ egerek LTR sejtjei máris elmaradtak a $HDC^{+/+}$ egerekéhez képest. Ezek az eredmények azt is sejtetik, hogy a hisztamin az aktívan ciklusban lévő sejtekre hat.

Összességében az nyilvánvalóvá vált, hogy bizony elégséges vérképzés zajlik a hisztaminhiányos egerekben, a különbségek mindössze a hematopoietikus stresszhatásra manifesztálódtak. Kísérleteinkben tehát demonstráltuk, hogy a hisztaminnak, annak

ellenére, hogy *in vitro* befolyásolja az őssejtek túlélését, osztódását és differenciálódását, valójában nincs alapvető *in vivo* szerepe a nyugalmi vérképzésben, hanem inkább csak szabályozó szerepet tölt be az ős- és a progenitorsejtek életében.

2. A HDC, a hisztamin és a hisztaminreceptorok expressziójának szabályozódása a csontvelői vérképzés során

Tanulmányunkban megpróbáltuk a HDC és a hisztamin, valamint receptorainak a vérképzésben betöltött szerepét az őssejtek génexpressziójának és a következményes fehérjeszintézisük szemszögéből is megvizsgálni. A génexpresszióban bekövetkező változások a sejtek fontos biológiai tulajdonságait tükrözik. Az őssejteket a sejtmegújulásra, osztódásra és differenciálódásra való képesség jellemzi. Ez a komplex rendszer a különböző fejlődési stádiumokra jellemző gének és fehérjéinek precíz szabályozása alatt áll. Feltételezések szerint a korai vérképzésben a HDC génje is szerepet játszik. Míg a HDC enzimmel és a hisztaminnal végzett kísérletekről számtalan adat létezik a szakirodalomban, addig mindössze csak néhány vizsgálat mutat be génexpressziós adatokat a HDC-ről vagy a hisztaminreceptorokról a vérképzés vonatkozásában[35,80,86-87]. Ezek közül kiemelendő Terskikh és munkacsoportja, akik leírták a HDC expressziójának fokozódását a granulocita-makrofág elköteleződés során[81], valamint Graf és társai, akik pedig a GM-CSF által mobilizált CD34+ sejtekben mutattak ki 13-szoros növekedést a HDC-termelésben[35].

A HDC jelenlétét a csontvelői őssejtekben mi is több szinten kimutattuk. A primitív, eritroid és mieloid kolóniákban a HDC gén expressziója szignifikánsan nagyobbnak bizonyult a kísérleteinkben vizsgált egyéb gének expressziójánál. A HDC mRNS-ét immunológiai módszerrel izolált (flow citométerrel kiválogatott, szortolt) csontvelői CD34+ sejtekben is igazoltuk. Fehérjeszinten pedig a különféle immunfenotípusú ős- és progenitorsejtekben bizonyítottuk és mértük meg az intracelluláris HDC és hisztamin termelődését.

A hisztaminmentes egerek késlekedő csontvelő-regenerációjának hátterében feltehetőleg a különböző regenerációs képességű őssejtek funkcióinak károsodása állhat, ami összefüggésben lehet a sejtek ciklusbeli aktivitásával. A vad genotípusú egerekkel végzett besugárzás-indukált csontvelő-regenerációs kísérletben tovább igazoltuk a HDC és a hisztamin specifikus szerepét a különböző aktivitással

regenerálódó sejtpopulációkban. A regenerációs fázisban jelentősen megnőtt a hisztamin és a HDC intracelluláris szintje, ami a hisztamin *de novo* szintézisét jelzi a vérképzés során. Ez legmarkánsabban a CD34+ és az STR sejtekben jelentkezett. Ezt a HDC gén fokozott expressziója előzte meg, amit a HDC mRNS szint mérésével igazoltunk. Az STR és LTR sejtek esetében határozott különbségeket tapasztaltunk, melyek híven tükrözik ezen sejttípusok viselkedését. Nevezetesen, a kezeletlen egerek nyugalomban lévő LTR sejtjeiben eleve kevesebb HDC-t és hisztamint detektáltunk, mint az aktívan osztódó STR sejtekben, és a regeneráció alatt az LTR sejtekben volt a legkisebb HDC termelődés is. Ezek az eredmények párhuzamosak azokkal a tanulmányokkal, amelyekben a primtív és az elkötelezettebb sejtek génexpressziós profilját hasonlították össze[35,80,194]. Manfredini és munkacsoportja közölte a CD34+/Lin- és CD34-/Lin- sejtek génexpressziós profiljának összehasonlító analízisét[80]. Kimutatták, hogy a CD34+, aktívan osztódó sejtek főként a sejtosztódás, a sejtciklusba való belépés valamint a metabolikus aktiváció génjeit (köztük a HDC génjét) expresszálták, míg a primitívebb CD34- sejtek inkább nyugalmi állapotban vannak, és a növekedést gátló géneket fejezik ki. Munkájuknak a Gene Expression Omnibus Profile internetes adatbázisban található microarray adatai (GEO referenciaszám: GDS1095) összecsengenek a mi STR és LTR sejtekben mért HDC expressziós eredményeinkkel.

A hisztamin specifikus receptorain kereszül fejti ki hatását a sejteken. A különböző csontvelői sejtek felszínén a hisztamin H1, H2 és H4 receptorát mutatták ki. Kísérleteinkben bebizonyítottuk, hogy míg a hisztamin a H2, és kisebb mértékben a H1 receptorain fejti hatását a regenerációban, addig a H4R valószínűleg nem játszik szerepet ebben e folyamatban. A csontvelő-regeneráció során a H1R és a H2R mRNS szintje, bár más kinetikával ugyan, de megemelkedik. Ez megfelel a nézetnek, mely szerint a hisztamin különböző hatást fejt ki a H1 illetve a H2 receptorain keresztül[157,225]. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a hisztamin a H2R-on keresztül serkenti az őssejteket, hogy a sejtciklusba belépjenek[184], valamint a H2R-ral hozzák összefüggésbe a hisztaminnak a granulocita és monocita sejtek osztódásában és differenciálódásában játszott szerepét[191,198]. A kísérletünkben tapasztalt, a regenerációs fázis alatt tartósan emelkedett H2R expresszió alátámasztja eme feltételezéseket.

A hisztaminreceptorok felszabályozódásának hátterében az állhat, hogy a regeneráció beindít folyamatokat, melyek következtében a HDC termelődés is megnő, ezáltal a hisztamin szintézise fokozódik. Ismert tény, hogy a hisztamin indukálja a receptorainak expresszióját[136], így biztosítva kifejezettebb hisztaminhatást a nagyobb számú receptorokon keresztül. Érdekes módon a $HDC^{-/-}$ egerekben is fokozódott a H1R és a H2R expressziója a regeneráció során, noha kisebb mértékben. Ez azt sejteti, hogy mivel ezekben az egerekben nincsen HDC vagy hisztamin, a hisztaminreceptorok fokozott génexpresszióját valószínűleg más növekedési faktorok idézték elő. Ez is bizonyítja, hogy az endogén hisztamin központi figurája a vérképzést irányító citokinhálózatnak[136].

Meglepő módon, hipotézisünkkel ellentétesen azonban, a H4R termelődése a regeneráció során lecsökkent. Bár a H4R-ról kiderítették, hogy leginkább hematopoietikus és immunsejteken (főleg hízósejteken és eozinofil granulocitákon) fejeződik ki, eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a hisztamin a csontvelő-regenerációban betöltött hatását nem ezen a receptorán keresztül fejti ki. Hozzá kell tennünk azonban, hogy mivel kísérleteink idejében nem létezett egér H4R ellenes antitest, ezért fehérjeszinten nem tudtuk ellenőrizni eredményeinket, valamint nem tudtuk a csontvelői sejtpopulációkra differenciáltan levonni következtetéseket a H4R-t illetően. Mindazonáltal, FACS-szal szétválogatott (szortolt) CD34+ sejtekben sem tudtuk kimutatni a H4R mRNS-ét, és a különböző CFU kolóniákban is csak kis mennyiségben expresszálódott. Megfigyelésünket bizonyos microarray adatok (GEO referenciaszám: GDS1604) is alátámasztják, melyek szerint egyes mielomonocita sejtvonalak besugárzását követően 7 nappal a H1R génaktivitása fokozódott, míg a H4R géné lecsökkent.

A $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerek különböző csontvelői szubpopulációinak H1R és H2R expressziójának összehasonlítása alapján állíthatjuk, hogy a hisztamin hiányában lecsökken a hisztaminreceptorok expressziója. A különböző sejtpopulációk hisztamin-receptor expressziós mintázata pedig összefüggésbe hozható a sejtek természetével. Így a korai regenerációért felelős STR és CD34+ sejtekben, melyek eleve a legtöbb hisztaminreceptorral rendelkeznek, nőtt a legnagyobb mértékben az intracelluláris hisztamin és HDC szint a regeneráció alatt. Ezzel szemben az LTR sejtek jóval kevesebb hisztaminreceptort expresszálnak, ennek megfelelően a HDC és

hisztamintermelésük is ezeknek a sejteknek volt a legcsekélyebb. Azonban a H2R viszonylag nagyobb arányban található meg a felszínükön, ami szintén alátámasztja azt a nézetet, miszerint a hosszútávú regenerációban a H2R játszik kiemelkedő szerepet. A $HDC^{-/-}$ egerek LTR sejtjei mindazonáltal a vad genotípushoz képest is jelentősen kevesebb H2R-t expresszálnak, ez lehet a magyarázata annak, hogy a hisztaminmentes egerek LTR sejtjei kevésbé lépnek ciklusba, ezáltal a regeneráció késik.

Kísérleteinkkel igazoltuk tehát, hogy a HDC és a hisztamin, valamint a hisztaminreceptorok eltérő mértékben fejeződnek ki a különböző csontvelői progenitor sejtpopulációkban, aminek a mértéke megfelel a sejtek nyugalmi illetve hematopoietikus stresszre kiváltott aktivitásának. Ezek az adatok demonstrálják, hogy a HDC expressziója szabályozódik a hematopoietikus kompartmentben, és hogy a vérképző ős- és progenitorsejtekben nagy mennyiségben megtalálható. Adataink azt is alátámasztják, hogy ezáltal a HDC és terméke, a hisztamin, valamint másodlagos módon a receptorai szabályozó szerepet töltenek be a vérképzésben.

3. A hisztamin befolyásolja az IL-3 jelátvitelt

Az ős- és progenitorsejtek szabályozása összetett folyamat, amiben számos növekedési faktor és citokin vesz részt, egymással több ponton kapcsolódó jelátviteli útvonalakkal és aktivált, vagy éppen gátolt génekkel[83]. Jelentős számú tanulmány vetette fel korábban már a hisztamin és az IL-3 kölcsönös és alapvető kapcsolatát a csontvelőben[136,140,182]. Ezt a mi eredményeink is alátámasztották: *in vitro* az IL-3 a HDC enzim szintézisét indukálta, *in vivo* pedig a csontvelő-regeneráció alatt megnövekedett HDC- és hisztamintermelődést detektáltunk a csontvelői ős- és progenitorsejtekben.

Feltételezésünk szerint az egyik mechanizmus, amellyel a hisztamin befolyásolja a csontvelői homeosztázist, az az IL-3 jelátvitel fő útvonalainak, azaz a JAK/STAT és/vagy a Ras/MAPK útvonalak szabályozása. A hisztaminmentes egerek vérképzése olyan eltéréseket mutat, melyek igen hasonlítanak az olyan egerek fenotípusához, amelyek genetikailag deficiensek az IL-3 jelátvitel egyes kulcsmolekuláira, úgymint az IL3Ra-ra, IL3Rb-re vagy a STAT5-re[44,63,68,74]. Dolgozatunkban bemutattuk, hogy a hisztamin és az IL-3 kölcsönhatása valóban a jelátvitel szintjén valósul meg, hiszen a $HDC^{-/-}$ egerek őssejtjei az IL-3 fő szignálmolekuláinak csökkent expresszióját és aktivációját mutatták, mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* kísérleteinkben. Besugárzást

követően, hisztamin hiányában az IL-3 szérum szintje alacsonyabbnak bizonyult, mint a vad genotípusú egerekben. Emögött a különböző csontvelői sejtpopulációk csökkent IL-3 termelése állhat. Legnagyobb mértékű különbségeket a mieloid vonal sejtjeiben, a CD11b+ mieloid prekurzorokban, az F4/80+ monocita-makrofág sejtekben, az ECP+ (eozinofil kemotaktikus potein pozitív) eozinofil granulocitákban, valamint a VCAM1+/CD45- strómasejtekben láttuk. A sejtfelszíni receptorok szintjén kimutattuk továbbá, hogy besugárzást követően a hisztaminmentes egerek regenerálódó (CD34+, Ckit+, STR és LTR) sejtjein az IL-3 receptor expresszió növekedése elmaradt a vad genotípusú egerekéhez képest. A specifikus IL-3 receptorlánc, az IL3Ra sejtfelszíni expressziójában mindössze mérsékelt különbség mutatkozott a két egérben. Azonban az IL3Ra génexpressziós szintjén már jelentős elmaradást láttunk a $HDC^{-/-}$ egerekben, főleg a progenitor kolóniákban (leginkább a BFU-E és CFU-GM sejtekben). Ez azt sugallja, hogy a hisztaminmentes sejtekben olyan celluláris mechanizmusok működnek, amik képesek kompenzálni a kiesett IL-3 funkciókat. Jelentősebb különbségeket tapasztaltunk azonban az IL-3 receptor közös béta láncának fehérjeszintű szintézisében. Ez nem meglepő eredmény, hiszen az IL3Rb több szignál útvonalnak is a része, így például a GM-CSF vagy az IL-5 jelátvitelének is, amelyekben a hisztaminnak bizonyítottan moduláló szerepe van a szignál kaszkádban és a növekedési faktorok receptor expressziójában[35,197,228-229]. Ismét igazolódni látszik az a feltevés, hogy a hisztamin része a vérképző sejtek élettanát meghatározó citokinhálózatnak azzal, hogy „beleszól" számos növekedési faktor jelátvitelébe: akár az IL3Rb expressziójának befolyásolásával. Összességében, az IL-3 termelésével és a receptoraival végzett vizsgálataink azt mutatják, hogy a hisztamin módosíthatja az IL-3-nak mind a hozzáférhetőségét, mind pedig a vérképző sejtek érzékenységét az IL-3-ra.

Ezeket az eredményeket *in vitro* is igazoltuk: a hisztaminreceptorok és a hisztaminhatás gyógyszeres gátlásával a $HDC^{-/-}$ egerekéhez hasonló IL-3 receptor expressziós eredményeket kaptunk a vad genotípusú sejteken.

Az IL-3 jelátvitel további szintjei is károsodtak a $HDC^{-/-}$ egerekben. Érdekes módon azonban, a MAPK1 expressziója nem volt olyan nagymértékben érintett az *in vivo* rendszerekben, figyelemre méltó különbségek csak a sejtek direkt IL-3 stimulációjára jelentkeztek. Ez azt jelzi, hogy *in vivo* más hatások és faktorok is befolyásolják ezt az útvonalat. Továbbá, a MAPK útvonal helyettesítő funkciókat is

betölthet, amellyel kompenzálhat a kiesett JAK/STAT hatásokért, mint ahogyan ez a TPO vagy a SCF esetében előfordul, amelyek a JAK/STAT vonalon kívül más jelátviteli molekulákat is aktiválnak, úgymint a Raf-1/MAPK vagy SHC molekulákat[68,75,226].

Ami a JAK/STAT útvonalat illeti, a $HDC^{-/-}$ egerekkel végzett kísérleteinkben bemutattuk, hogy a hisztamin modulálja a STAT5 aktiváció kinetikáját. A STAT5 transzkripciós faktor, mely nélkülözhetetlen az őssejtek megfelelő működéséhez, érzékenyíti őket a növekedési faktorok hatására, meghatározza a repopulációra, az osztódásra, valamint a differenciálódásra való képességüket[65,68]. Az irodalomban közölt eredmények szerint a STAT5-deficiens egerek vérképzése súlyosan károsodott, ami főként az őssejtkompartmentben érvényesül, és a csontvelői regenerációt komolyan befolyásolja[44]. Saját vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a $HDC^{-/-}$ egerek STAT5 expresszió jelentősen csökkent a vad típushoz képest. Ezt mind a különböző kolóniákban, mind pedig a regenerálódó sejtpopulációkban észleltük. Ez alapján levonhatjuk a következtetést, miszerint a hisztamin befolyásolja a STAT5 szabályozását a progenitorok osztódása és érése során. Mindazonáltal, nem csak a STAT5 mennyiségét, hanem aktivációjának mértékét, a foszforilált STAT5 (P-STAT5) szintjét is meghatározta a hisztamin hiánya. Több mechanizmus is magyarázatul szolgálhat e jelenségre. Egyik magyarázat szerint a P-STAT5 szintjének csökkenése bizonyos esetben megnövekedett defoszforilációs ráta következménye lehet. Másrészről azonban elképzelhető, hogy a $HDC^{-/-}$ sejtekben a JAK/STAT útvonal összességében negatívan szabályozódik, és ez okozza a csökkent STAT5 aktivációt. Ez utóbbi elképzelés felveti egyes negatív moduláló molekulák, mint például a SOCS vagy CIS molekulák szerepét az IL-3 jelátvitelben[65,67]. Bármelyik hipotézis is igazolódik a jövőben, kísérleteinkből annyi bizonyosan levonható, hogy a hisztamin jelenléte nagyobb STAT5 fehérjeraktárat jelent a vad genotípusú sejtekben, amely ráadásul sokkal hatékonyabb foszforilációval is jár együtt. Ez a kettő együtt pedig eredményesebben továbbítja a mitogén szignálokat a vad típusú csontvelői sejtekben.

Kísérleteinkkel tehát igazoltuk, hogy a hisztamin befolyásolja az IL-3 jelátvitelét. Ez a hatás több szinten, az IL-3 termelésén, receptorainak és jelátviteli molekuláinak (főleg a STAT5) expresszióján és foszforilációján keresztül érvényesül.

4. A hisztamin szerepe a vérképző sejtek ciklusában

Kísérleteink alapján úgy tűnik, hogy a hisztamin a sejtciklusban aktívan részt vevő sejtekre hat, mégpedig nagy valószínűséggel a sejteknek a ciklusba lépését szabályozza, amint azt már korábban Zhao és mtsai illetve Byron is felvetette[37,184]. A hisztamin e hatását valószínűleg az IL-3 jelátvitelén, és ezen belül a STAT5 aktivációján keresztül fejti ki. A STAT5 számos célmolekulát aktivál a sejtekben, köztük sejtciklust szabályozó géneket. Kiemelendő közülük a ciklin D1, mely elsősorban a primitív hematopoietikus sejtekben expresszálódik. Ez a molekula lehet az egyik célmolekula, melyen keresztül a STAT5 regulálja a G_1-S progressziót, és ezzel a sejtciklusba lépést[65,69]. A $HDC^{-/-}$ egerekben ez a G_1-S átmenet lehet érintett. Erre utal az a megfigyelésünk, hogy bár nem volt különbség a kezeletlen egerek sejtjeinek ciklusbeli állapotában, IL-3 stimulációra azonban a hisztaminmentes sejtek már elmaradtak az S-fázisban. Ezzel összefügg az a megfigyelésünk is, miszerint a besugárzást követő csontvelő-regeneráció során abban a fázisban láttuk a legnagyobb elmaradást a $HDC^{-/-}$ egerekben a sejtszámok, valamint az IL-3 receptor expresszió és jelátvitel tekintetében, amikor az alapvetően nyugvó állapotú LTR sejtek belépnek a ciklusba. Alátámasztja ezt a feltételezésünket továbbá a HDC enzim és a hisztamin különböző termelődése a regeneráció alatt, ami szintén megfelelt az STR és az LTR sejtek ciklusbeli állapotának.

Itt kell megemlítenünk, hogy a másik vizsgált jelátviteli kulcsmolekula, a MAPK, melynek expressziójában nem találtunk különbségeket a $HDC^{-/-}$ egerekben *in vivo*, szintén befolyásolja a sejtciklust, azonban a STAT5-tel ellentétes módon: a ciklin dependens kináz (CDK) gátlásával a sejtciklust megállítja a G_1 fázisban, ciklus leállást („arrest”-et) okoz, ezzel inkább a differenciálódást segíti elő[75-76].

Mivel a G_1 fázis a sejtek életében olyan szakaszt jelöl, amelyben elsősorban nagy mennyiségű fehérjeszintézis zajlik, a $HDC^{-/-}$ egerek ős- és progenitorsejtjei a hosszabb G_1 fázisukban jelentősebb mennyiségben tudják felhalmozni azokat a kulcsfontosságú intracelluláris molekulákat, melyek a differenciálódási programok elindításához szükségesek[83]. Ez megmagyarázhatja a $HDC^{-/-}$ egerekben tapasztalt nagyobb arányát a differenciáltabb CD11b+ sejteknek, amelyek felelőssé tehetők az emelkedett csontvelői összsejtszámért, valamint a nyugvó állapotban és a hematopoietikus stresszben észlelt alapvetően normális perifériás sejtszámokért.

Mindazonáltal, míg a hisztamin hiánya fékezte a sejtciklusba lépést, és csökkentette az S-fázisba lépő sejtek arányát az IL-3 stimulációt követően, mégsem gátolta meg teljes mértékben a G_1-S progressziót. Továbbá, kísérleteinkben nem tapasztaltunk markáns különbségeket a nyugalmi helyzetben a sejtek ciklusbeli állapotában, valamint a hematopoietikus jelátvitelben. Ebből adódik tehát, hogy a $HDC^{-/-}$ egerek ős- és progenitorsejtjeinek proliferációs képességét (DNS szintézist) csak részlegesen gátolta a hisztamin hiánya. Több kompenzáló mechanizmus is magyarázhatja ezt az inkomplett növekedési gátlást. Hasonló kompenzáló mechanizmusokat számos citokin, köztük az IL-3, IL-5 és a GM-CSF jelátvitelének vizsgálata kapcsán írtak már le[51,67,72,197,226].

Az első abból adódik, hogy a hisztamin magában vagy a STAT5 aktivációján keresztül számos target gént szabályoz, melyek közül néhány a sejtosztódásban játszik fontos szerepet (például a c-fos), míg mások (mint például a cis) negatívan szabályozzák a proliferációt[136,197]. A hisztaminmentes sejtekben tapasztalt részleges osztódási gátlás a fenti antagonista hatású gének aktivációjának nettó hatásaként jöhet létre.

Egy másik lehetőség, hogy a citokinekre, köztük az IL-3-ra adott teljes proliferációs válasz számos, egymástól független és redundáns szereppel bíró jelátviteli útvonal összehangolt működésén keresztül valósul meg[68,72]. A STAT5 és a MAPK remek példája ennek, de ilyen továbbá az IL3Rb is, mely több doménnel bír, amelyeken keresztül több párhuzamos jelet tud közvetíteni[67]. Ezt a hipotézist a MAPK1 expressziós vizsgálataink támasztották alá, ugyanis a MAPK útvonal defektusa csak *in vitro* direkt IL-3 stimulációra jelentkezett, *in vivo* különbség nem mutatkozott a két genotípusú egérben.

Ebből a megfigyelésből adódik a harmadik magyarázat, miszerint más hematopoietikus növekedési faktorok képesek helyettesítő szerepet játszani az őssejtek proliferációs funkciójának szabályozásában[51,67].

Bármi legyen az igazi magyarázat, a jövőben érdemes lehet a HDC és a hisztamin szerepét más citokinek jelátviteli utak és génaktivációk vonatkozásában is megvizsgálni.

5. A hisztamin szabályozza az ős- és progenitorsejtek differenciálódását

A hisztamin nem csak a proliferációját befolyásolja az ős- és progenitorsejteknek, hanem a differenciálódásukat is, ami által a különböző sejtvonalakat hozzák létre. A HDC enzim és a mieloid elköteleződés közötti kapcsolatot több szerző is leírta már korábban[35,81,190]. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a hisztamin a mieloid differenciálódáson túl az eritroid elköteleződésben is egyaránt szerepet játszik a csontvelőben. Hisztamin hiányában főként a BFU-E és CFU-GEMM kolóniák száma csökkent le, a CFU-GM kolóniák kismértékű csökkenése mellett, ami jelzi a hisztamin alapvető szerepét a közös eritroid-mieloid progenitor sejt szintjén. Továbbá, az IL-3 jelátviteli molekulák (IL3Ra és a STAT5) expressziójában a $HDC^{-/-}$ egerek a legnagyobb defektust a CFU-GM kolóniákon kívül a BFU-E sejtekben is mutatták. Ez azt is sugallja továbbá, hogy a hisztamin ezt a hatását az IL-3 jelátvitelén, a STAT5-ön keresztül fejti ki. Bizonyos közlemények a STAT5 expresszióját főleg az eritroid vonal differenciálódásával hozták összefüggésbe[69-70,193]. A hisztaminhiányos egerek eredményeivel megegyeznek továbbá azok az adatok, amelyeket Li illetve Teglund és munkacsoportjaik közöltek STAT5-deficiens állatok károsodott eritroid, mieloid és limfoid differenciálódásáról[72,74].

Mindazonáltal, egyéb molekuláris mechanizmusok defektusai is felvetődnek a differenciálódási eltérések hátterében. Bizonyos tanulmányok szerint a Ckit normális funkciója szükséges a BFU-E expanziójához[48]. A hisztaminhiányos egerekben kimutattuk a Ckit sejtfelszíni expressziójának csökkenését, ami szintén hozzájárulhat a csökkent BFU-E kolóniaszámokhoz.

A teljesség kedvéért hozzá kell tenni azonban, hogy – bár egyes közlemények leírják a STAT5 központi szerepét a limfoid differenciálódásban, miszerint hiányában súlyos immundeficiencia alakulhat ki[230-231] – a mi kísérleti rendszerünk nem volt alkalmas a limfoid előalakok vizsgálatára. Azonban az érett, CD19+ B-sejtek és a különböző, CD3+, CD4+, CD8+ T-sejt szubpopulációk csontvelői arányában nem találtunk jelentős különbséget $HDC^{-/-}$ és a vad genotípusú egerek között.

Mindazonáltal, a $HDC^{-/-}$ egerekben ezeket az elváltozásokat is – mind az eritroid, mind a mieloid sejtvonalakban – csak a közös progenitorok szintjén láttuk. Az eritroid vonalon belül az elköteleződött, Ter119+ progenitorsejtek valamint az érett

vörösvérsejtek arányában nem volt szignifikáns különbség. A mieloid vonalban ráadásul emelkedettebb CD11b+ sejtarányt detektáltunk a hisztaminmentes egerekben, következményesen emelkedett csontvelői összsejtszámmal. Ezek hátterében a korábban kifejtett meglassult G_1-S átmenet és a G_1 szakaszban felhalmozódó, differenciálódást elősegítő molekulák állhatnak.

Összegezve tehát, a hisztamin hiánya negatívan befolyásolja az ős- és progenitorsejtek korai differenciálódási folyamatait, azonban a sejtvonalak további érése során ezekben a folyamatokban szabályozási zavar következik be. Ez utóbbi jelenségben szerepe lehet a hisztamin hiányában megváltozott csontvelői környezetnek is (lásd alább). E kompenzáló mechanizmusok lehetnek a felelősek azért, hogy a periférián a vörös- és fehérvérsejtszámok mindvégig a normál tartományban maradtak a hematopoietikus stresszhatást követően csakúgy, mint a kontroll helyzetben.

6. A hisztamin és az ős- és progenitorsejtek mobilizálása

Egy másik mechanizmus is magyarázhatja a hisztaminnak a sejtosztódásra és differenciálódásra kifejtett hatását. Modulálhatja azon sejtfelszíni molekulák expresszióját, amelyek a megfelelő kapcsolódást biztosítják a hematopoietikus és strómasejtek között. Míg a CD34 az endotélsejtek felszínén lévő szelektinekhez kötődik, addig a Ckit a strómasejtek felszínén megjelenő SCF-hez (stem cell factor, őssejtfaktor) kapcsolódik[45-46]. Ezek a molekulák a különböző őssejtfunkciókban játszanak moduláló szerepet, úgymint növekedés, túlélés és differenciálódás, amellyel a csontvelő kiirtását követően a vérképzés helyreállhat[47-48]. Míg Sca1-knockout egerekben az őssejtek önmegújulási folyamata károsodik[87], addig az 5-fluorouracil kezelést követő progenitor mobilizációért a Ckit expressziójának csökkenése tehető felelőssé[47]. A besugárzás-indukálta regenerációs kísérletünkben a hisztamin hiányában mi is csökkent sejtfelszíni megjelenését találtuk a CD34, Sca1 és Ckit fehérjéknek, ami kevesebb kapcsolódási pontot jelent a hematopoietikus progenitorsejtek és a támasztó stróma között. Mivel ez a kommunikáció határozza meg a prekurzor sejtek elköteleződésében a fejlődési folyamatokat és a tranzitidőt a különböző csontvelői kompartmentek között[232], a stróma-progenitor kapcsolat működési zavara magyarázhatja a $HDC^{-/-}$ egerek lassabb repopulációját és a bizonyos sejtvonalakban tapasztalt változásokat. Valószínűleg ezek a hatások is hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a

differenciált alakok feldúsúlnak, mert kellő integrin-stimulusok nélkül a sejtek nem tudnak megfelelően kiszabadulni a csontvelői miliőből. Ez okozhatja a hisztaminhiányos egerekben tapasztalt nagyobb csontvelői cellularitást, míg a periférián a sejtszámokban nincs különbség.

Eddig bemutatott eredményeinket összefoglalva tehát mind azt a felvetést támasztják alá, miszerint az endogén hisztamin fontos szereplője annak a citokinhálózatnak, mely a vérképzés jól szervezett apparátusát irányítja. A mieloid és a hízósejtek érési folyamataiban betöltött jól ismert feladatain kívül a hisztamin jelentős és nélkülözhetetlen tagja az ős- és prekurzor sejtek fiziológiás szabályozásának. Tanulmányunkban mind *in vitro,* mind *in vivo* bizonyítékokat szolgáltattunk arra vonatkozóan, hogy a hisztamin hiánya hogyan zavarja meg a működését ennek a komplex szabályozási hálózatnak, valamint hogy a hisztamin elengedhetetlen a STAT5 aktiváción keresztül megvalósuló megfelelő IL-3 hatáshoz.

7. A hisztamin hatása az extramedulláris vérképzésre

A vérképzés elemzése során nem szabad figyelmen kívül hagynunk azt a tényt, miszerint vérképző sejtes elemek nem csak kizárólagosan a csontvelőben találhatók. Nyugalmi helyzetben ezeknek a sejteknek alárendelt szerepük van, azonban igencsak megnő a jelentőségük olyan kórállapotokban, amikor a csontvelő nem képes ellátni a funkcióját, ilyenkor aktív vérképzéssel járulnak hozzá a nyugalmi állapot helyreállításához. Kísérleti modellünkben az egerek egésztest-besugárzásban részesültek, ami a csontvelőt kimerítette, ezáltal beindultak az extramedulláris vérképző folyamatok. A hisztamin hiányában módosult hematopoietikus funkciók teljes értékeléséhez szükségesnek tartottuk tehát a lépben zajló extramedulláris vérképzés analízisét. Ezáltal megvizsgálhattuk, hogy a hisztamin hatása az őssejtekre vajon ténylegesen endogén hatás-e, azaz szisztémásan érvényesül-e az egész szervezetben, valamint lehetőségünk nyílt felderíteni a hisztaminnak a hematopoietikus hierarchiában betöltött szerepét is.

Érdekes módon, annak ellenére, hogy hisztamin hiányában a csontvelőben a regenerációs folyamatok az őssejtek szintjén károsodtak, a perifériás vérképben ez a hatás nem nyilvánult meg, ami kompenzációs mechanizmusokat sejtet a $HDC^{-/-}$ egerek

szisztémás vérképzőrendszerében. A besugárzást követő harmadik napon tapasztalt viszonylagosan kisebb lépsejtszám-csökkenés oka vagy ezen egerek hatékonyabb extramedulláris vérképzése, vagy sejtjeik megnövekedett sugárrezisztenciája lehet. Az *in vivo* besugárzás-indukált csontvelői regenerációs modellel és a hisztaminmentes hematopoietikus sejtek *in vitro* besugárzásával végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy a $HDC^{-/-}$ vérképző sejtek túlélése a sugárhatást követően súlyosan sérül. Ezek alapján összességében azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a besugárzást követő kisebb lépsejtszám-csökkenés hátterében a $HDC^{-/-}$ egerek megnövekedett extramedulláris vérképzése állhat, amely kompenzálhatja a kiesett csontvelői funkciókat a regeneráció korai szakaszában. Ez a hatás ugyanakkor csak átmenetinek bizonyult, és a vizsgált őssejtek analízise nem adott egyértelmű magyarázatot, hogy mely populáció lehet felelős a relatív sejtszaporulatért. Egy hét elteltével azonban végül a hisztaminmentes egerek a csontvelőhöz hasonlóan késlekedést mutattak a lép vérképzésében is, ami a $HDC^{-/-}$ egerek extramedulláris hematopoiezisének hosszútávú károsodását jelzi.

A csökkent őssejtszám és a vérképzés késésének hátterében a hisztaminnak azt a korábbiakban igazolt intracelluláris hatását feltételeztük, miszerint a hiánya negatívan befolyásolja az IL-3 jelátvitelét a STAT5 molekula szabályozási zavara által. A lépben – a csontvelőtől eltérően – ezt a hatást leginkább a mieloid sejtvonalban láttuk. A $HDC^{-/-}$ egerekben mind a STAT5 mRNS expresszió, mind a STAT5 fehérje foszforilációja szignifikánsan csökkent a különböző érési stádiumban lévő mieloid sejtekben. Ez összefügghet azzal a megfigyelésünkkel, miszerint a lépben jóval nagyobb HDC expressziót mutattak a mieloid (CFU-GM) kolóniák, mint a csontvelőben, ami magyarázhatja a $HDC^{-/-}$ lép jelentős CFU-GM kolóniaszám-csökkenését is. Ez kihat a mieloid differenciálódásra is: kimutattuk, hogy már a nyugalmi állapotban is kevesebb volt az egyes mieloid sejtvonalak (a CD11b+ valamint az F4/80+ sejtek) aránya a $HDC^{-/-}$ egerek lépében. Ezen eredmények egybecsengenek azokkal a megfigyelésekkel, melyek szerint a hisztamin kiemelkedő szerepet játszik a granulocita-makrofág elköteleződésben[81,193], illetve a mieloid differenciálódásban[131,190]. Mindazonáltal kísérleteinkben nem sikerült igazolni eltérést a korai progenitorok és őssejtek STAT5 aktivációjában annak ellenére, hogy a közös progenitor (CFU-GEMM) kolóniák HDC termelése a csontvelőhöz hasonlóan magas volt, és hogy a regeneráció 7. napjára ezekben a sejtekben is elmaradás mutatkozott a $HDC^{-/-}$ egerekben. Ez azt sugallja, hogy

a lépben észlelt vérképzési defektust a hisztamin hiánya nem az IL-3 jelátvitelén keresztül modulálja, hanem valószínűleg más citokinek vagy jelátviteli útvonalak által. Egy ilyen feltételezett mechanizmus lehet a Ckit molekula kifejeződésének defektusa. A Ckit csökkent expresszióját igazoltuk a hisztaminhiányos egerekben, és ezzel hozható összefüggésbe bizonyos Ckit-deficiens egerekben észlelt fokozott extramedulláris hematopoiezis is[120].

Említésre méltó, hogy – megintcsak a csontvelővel ellentétben – a lép eritroid vérképzésében a hisztaminnak úgy tűnik, nincsen szerepe, hiszen a BFU-E kolóniák HDC expressziója elhanyagolható volt a többi kolóniához képest, és ennek megfelelően az eritroid kolóniák számát sem befolyásolta a hisztamin hiánya. Ez is hozzájárulhat ahhoz, hogy a perifériás vörösvérsejtszám intakt marad a regeneráció folyamán, amennyiben a lép megfelelően tudja kompenzálni a csontvelő kiesett vörösvérsejt-termelését.

A regeneráció korai szakaszában észlelt hatékony extramedulláris vérképzés egyéb, indirekt regulációs mechanizmusokat is feltételez. A lépsejteken végzett *in vitro* proliferációs assay és sejtciklus-analízis – a csontvelőtől eltérően – nem mutatott különbséget a hisztaminhiányos sejtekben, ami azt sejteti, hogy az intrinsic hatás mellett *in vivo* inkább az indirekt mechanizmusok befolyásolják a hisztamin hatásását a lépben. A csontvelő és a lép eltérő környezetet biztosítanak a sejtek számára, eltérő regulációs mechanizmusokkal. Vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy a lépben a dendritikus és T-sejtek mediálják eme folyamatokat.

A besugárzásra kevéssé érzékeny T-sejtek termelik az ős- és progenitorsejteket irányító hematopoietinek és citokinek, többek között az IL-3, nagy részét. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a $HDC^{-/-}$ egerek lépében a T-sejtek száma és működése zavart szenved. Nyugalmi állapotban a hisztaminmentes egerekben kisebb arányban vannak jelen a Th sejtek, míg a CD25+ regulátoros T (Treg) sejtek száma magasabb. Már itt megmutatkozik a lép és a csontvelő eltérő szabályozó funkciója, ugyanis a csontvelőben éppenhogy alacsonyabb Treg sejtarányt mértünk. A Treg sejtek kifejezetten gátolják az immunválasz kialakulását[233]. Ez az immunszuppresszív hatás tehát a $HDC^{-/-}$ egerek lépében, nyugalmi állapotban érvényesül, és a Treg sejtekhez köthető (lásd alább). A hisztamin hiányában megváltozott T-sejt szabályozást igazolja

továbbá az a megfigyelésünk, mely szerint IL-3 kezelés hatására elégtelen STAT5 aktivációt detektáltunk a HDC$^{-/-}$ egerek T-sejtjeiben, különösen a CD3+/CD4+ Th csoportban, mely eltérést a csontvelői T-sejtekben nem észleltük. Mivel a T-sejtek (Th, Tc és Treg sejtek) regulációjának központi szabályozó mechanizmusa a STAT5 jelátvitel, ennek defektusa esetén a T-sejtek által mediált folyamatok súlyosan károsodhatnak[233-234]. Ezek az eredmények összhangban állnak azzal a megfigyeléssel, hogy a STAT5-deficiens egerekben a T-sejt reguláció is zavart szenved, és ezzel párhuzamosan az extramedulláris vérképzés is jelentős mértéket ölt[72].

A T-sejtek működését a dendritikus sejtek befolyásolják. A dendritikus sejtek, mint az immunválasz karmesterei határozzák meg azt a miliőt, amelyben az immun- és egyéb sejtek működnek, aktiválódnak és gátlódnak, mely által az éppen szükséges mértékű immunreakció kialakul. Feltételezhető, hogy az immunrendszer működésében központi szerepet játszó dendritikus sejtek az extramedulláris vérképzésben is fontos szereppel bírnak. Bizonyítja ezt az a megfigyelés, mely szerint olyan egerekben, melyekből genetikailag hiányoznak a konvencionális dendritikus sejtek, kiesik a normális dendritikus sejt szabályozás, ami végül kiugró extramedulláris vérképzést eredményez[121]. Saját, lépből nyert dendritikus sejtekkel végzett kísérleteink is alátámasztják e feltételezést. Munkacsoportunk kimutatta, hogy a HDC$^{-/-}$ egerekben jelentősen emelkedett a Th_2 típusú IL-10 termelődése. Néhány munkacsoport igazolta bizonyos regulátoros funkciójú dendritikus sejt szubpopulációk létezését, melyek nagy mennyiségben termelnek IL-10-et, a naiv T-sejteket Treg sejtekké polarizálják, és ezáltal az aktivált T-sejtek proliferációját gátolják[235-237]. Az is ismert tény, hogy az IL-10 közvetlenül is gátolja az antigénbemutatás folyamatát azáltal, hogy késlelteti a dendritikus sejtek érését és kostimulációs molekuláinak expresszióját[238-239]. Az emelkedett IL-10 tehát jelzi, hogy a hisztamin hiányában döntően immunszuppresszív folyamatok érvényesülnek, amit alátámaszt az általunk is tapasztalt magasabb Treg sejtarány. Immunaktivációra azonban a HDC$^{-/-}$ dendritikus sejtek IL-10 termelése szignifikánsan csökken, és a Th polarizáció a Th_1 típusú immunválasz irányába tolódik, ami hatékonyabb antigénbemutatást és immunválaszt eredményez ezekben az egerekben. Mivel a besugárzást követő első napokat a gyulladásos reakciók jellemzik mind a csontvelőben, mind a lépben[85,115], ez a T-sejtek és dendritikus sejtek által

közvetített hatékonyabb válaszreakció állhat a korai effektív extramedulláris vérképzés hátterében a $HDC^{-/-}$ egerekben.

Eredményeinkkel bizonyítottuk tehát, hogy a hisztaminnak az IL-3 jelátvitelére kifejtett hatása endogén, és érvényesül a lép sejtjeiben is. Ez a hatás leginkább a mieloid vonalban észlelhető. Kimutattuk továbbá, hogy a lépben nemcsak az endogén intracelluláris hatások érvényesülnek, hanem a sejtek proliferációját környezeti, intercelluláris immunológiai hatások is befolyásolják, amelyeket szintén a hisztamin modulál.

8. A hisztamin szerepe az ős- és progenitorsejtek apoptózisában

Az eddigiekben a hisztamin szerepét a besugárzást követő regenerációs vérképzésben vizsgáltuk. A hatékony vérképzés azonban nemcsak a progenitorsejtek osztódási képességétől és a különböző differenciálódási stádiumokon való keresztülhaladás tranzitidejétől függ, hanem a károsodást túlélő őssejtek számától is[2]. Kísérleteinkben tehát megvizsgáltuk az apoptózis specifikus markereit $HDC^{+/+}$ és $HDC^{-/-}$ egerekben.

Eredményeink alapján levonhatjuk a következtetést, miszerint hisztamin hiányában valóban fokozódik a sejtek apoptóziskészsége. Azonban a különbségek itt is inkább csak a stresszhatást (besugárzást) követően öltöttek szignifikáns mértéket, az őssejtszámok fiziológiás szabályozásában tehát a hisztamin valószínűleg nem játszik szerepet. Mindazonáltal, ezzel alátámasztottuk azt a megfigyelést, hogy a hisztamin védő faktorként funkcionál a kezdeti sugárzás-indukált sejtkárosító folyamatokban[216-217]. Azonban *in vivo* besugárzást követően kevésbé markánsan jelentek meg ezek a folyamatok, mint *in vitro* besugárzást követően. Ez arra enged következtetni, hogy *in vivo* a csontvelő komplex rendszerében más mechanizmusok kompenzálhatják a kiesett hisztaminfunkciókat. A különbségeket mi főleg a CD95 által közvetített útvonalban tapasztaltuk, amely a citotoxikus T-sejtek által indukált apoptózisban játszik központi szerepet. Ez felveti, hogy a hisztamin hiányában megváltozik az az immunológiai környezet, amely biztosítja a sejtek, így a vérképző őssejtek megfelelő reakcióját és védelmét a károsodással szemben. Alátámasztja ezt az a bazofilekben tett megfigyelés, miszerint a Th_1 típusú citokinek fokozzák ezen sejtek apoptózisát, ami összefüggésben állhat megváltozott hisztamintermelésükkel is[97]. A $HDC^{-/-}$ egerekben mi is az immunválasz Th_1 irányú eltolódását tapasztaltuk, ez

magyarázatot adhat a fokozott apoptóziskészségre. Továbbá, a hisztaminhiányos egerek megnövekedett apoptózisa összefüggésben állhat a mieloid sejtjeikben észlelt defektussal, ugyanis a Fas/FasL kölcsönhatás direkt moduláló hatást fejt ki a neutrofil granulociták sejthalálára[119].

A komplex kölcsönhatásokat bizonyítja az a megfigyelésünk is, hogy a hisztamin szintézisének gátlása fokozott apoptózist eredményezett a vad genotípusú sejtekben, de a felszíni receptorok blokkolása nem. Ez felvetette azt a lehetőséget, hogy ez utóbbi esetben a hisztamin a hatását vagy más receptoron (például a H4R-en) keresztül fejti ki, vagy más mechanizmus által.

Meg kell jegyeznünk, tekintettel az apoptózis bonyolult és szerteágazó folyamataira, hogy az általunk végzett kísérletek egyelőre csak néhány útvonal vizsgálatára korlátozódtak, így csak tájékozódó jellegűnek tekinthetők. Ahhoz, hogy ténylegesen felmérjük a hisztamin hatását az apoptózis folyamataira, több mechanizmust kellene tanulmányozni, illetve génexpressziós vizsgálatokat is kellene végezni. Kísérleteinkben mi egyedül a STAT5 és a MAPK génexpresszióját vizsgáltuk. A STAT5 közismerten antiapoptotikus funkcióval bír azáltal, hogy a bcl-2 expresszióját fokozza[65,69]. A $HDC^{-/-}$ egerekben tapasztalt csökkent STAT5 expresszió és aktiváció tehát egyféle magyarázattal szolgálhat a hisztaminhiányos sejtek fokozott apoptózisára. Egyre több adat áll rendelkezésre a szakirodalomban a MAPK apoptózisban betöltött szerepét illetően, azonban az eredmények ellentmondásosak. Egyes adatok szerint a MAPK a stressz-indukált apoptózis fő jelátvivő molekulája[87], mások szerint azonban az IL-3 jelátvitel disztális útvonalaként inkább antiapoptotikus hatással bír[67]. Kísérleteinkben vizsgáltuk a MAPK expressziójának alakulását besugárzást követően, azonban jelentős eltérést a hisztaminhiányos egerekben nem tapasztaltunk. Különbségeket főként az *in vitro* proliferációs kísérletekben észleltünk, s ez inkább az utóbbi feltételezést valószínűsíti.

Mindezek alapján egyre inkább nyilvánvalóvá válik, hogy a hisztamin leginkább túlélési faktorként játszik szerepet a vérképző ős- és progenitorsejtek életében: amennyiben jelen van, az osztódásukat segíti elő, hiányában azonban előtérbe kerülnek és aktiválódnak az apoptotikus folyamatok.

Eredményeinket összefoglalva tehát megállapíthatjuk, hogy a hisztamin jelentős hatást fejt ki a hematopoietikus őssejtekre, amennyiben serkenti proliferációs és differenciálódási képességüket. Adataink szerint mindezen folyamatokban meghatározó a hisztaminnak az IL-3 jelátvitelére gyakorolt pozitív moduláló hatása a STAT5 aktivációján keresztül, bár egyes esetekben nem lehet kizárni más citokinek, útvonalak és egyéb intercelluláris mechanizmusok befolyását sem.

E következtetések megbízhatóságának és súlyának helyes értékeléséhez ugyanakkor figyelembe kell vennünk azt a tényt, hogy eredményeink még mindig számos további kérdést vetnek fel, amelyeket a jövőben mindenképp érdemes körüljárnunk.

Az első ilyen kérdés maga a különböző őssejt-populációk jellemzése. Kísérleteinkben az őssejtek jellemzéséhez többféle megközelítést alkalmaztunk, pl. a FACS-os mérés során STR-LTR, a kolóniaformáló assay során CFU-GEMM, CFU-GM és BFU-E meghatározást végeztünk. A mai szakirodalomban is nagy kérdés, hogy ezek a különböző jellemzések mennyire felelnek meg az egyes őssejttípusoknak, mennyire fednek át egymással, és így mennyire vethetők össze a különböző technikákkal nyert eredmények. Továbbá egyes besugárzásos kísérletekben a sejtek RNS izolálás céljából történő, megfelelő mértékű (őssejt szintű) szeparálását technikailag nem tudtuk megoldani az alacsony összsejtszám miatt, így az osztódó csontvelői sejtekről általánosságban kellett következtetést levonnunk. A jövőben a kifinomult izolálási technikák fejlesztése (pl. szortolási módszerekkel) jelenthet megoldást erre a problémára.

Továbbá, érdemes lenne microarray módszerrel megvizsgálni a génexpressziós profil változását a $HDC^{-/-}$ egerek hematopoietikus őssejtjeiben a vérképzés és regeneráció során, hogy pontosabb információt nyerhessünk a HDC és hisztaminreceptorok szerepét illetően a vérképzésben.

Kísérleteinket a csontvelő-regeneráció korai szakaszának vizsgálatára koncentráltuk. Azonban a teljes regeneráció folyamata hetekig-hónapokig is eltarthat, melynek kimenetelére következtethetünk a korai szakasz kinetikájából, de egy teljes vizsgálathoz elengedhetetlen a késői időszak analízise is. Ráadásul csak további funkcionális vizsgálatokkal, pl. csontvelő-átültetéssel igazolhatjuk, hogy a hisztamin-hiányos őssejteknek a teljes hematopoietikus homeosztázis létrehozására való képessége

feltehetőleg csökkent. Ezen kísérletek már folyamatban vannak, azonban tekintettel a csontvelő-transzplantációs vizsgálat hosszú kifutási idejére, jelen tanulmányunkban e vizsgálatok eredményei nem szerepelnek.

Mindenképpen meg kell említenünk, hogy irradiációs kísérleteinkben mi főleg az őssejtek (STR, LTR sejtek) funkcióira (sejtosztódás, differenciálódás) fókuszáltunk, a vérképzés érett vagy érésben lévő sejtjeinek reakciójára többnyire csak indirekt módon következtettünk. Ez főleg a mieloid differenciálódási vonalra vonatkozott, melynek részeletes jellemzése e munka kereteit meghaladta volna. E tekintetben szabadon hagyatkoztunk a saját és más laboratóriumok kísérleti eredményeire, melyekben a hisztamin hatásait vizsgálták különböző mieloid sejtekben, illetve hisztaminhiányos egerek izolált sejtjein. Azonban a jövőben mindenképpen érdemes lehet megvizsgálni a vérképzés főbb sejtvonalainak differenciálódását a $HDC^{-/-}$ egerekben, különösen hematopoietikus stresszt követően.

Az eredmények értékelése után megfogalmazódó további jövőbeli célunk feltérképezni a hisztaminhiányos őssejtek csökkent proliferációs képességének hátterében álló egyéb molekuláris és jelátviteli hatásmechanizmusokat. Bár a csontvelőben egyértelműen kimutattuk az őssejtek csökkent osztódási képességét, és az ezzel kapcsolatban az IL-3-STAT5 jelátviteli út szerepét, a lépben nem volt ennyire nyilvánvaló ez az összefüggés, ami felvetette egyéb molekuláris illetve immunológiai mechanizmusok szerepét. A jövőben tehát a folyamat teljes megértésének érdekében ezt a kérdéskört tervezzük még alaposabban is körüljárni.

VI. Következtetés

Jelen dolgozat célja a hisztamin hatásainak vizsgálata a vérképzőrendszer progenitor- és őssejtjeiben. A vérképzés rendkívül komplex folyamat, melynek rendeltetésszerű funkciója számos sejttípus, citokin, receptor, jelátviteli útvonal, génaktiváció és immunológiai mechanizmus összehangolt és finoman szabályozott működését igényli. A vérképző rendszer tulajdonképpen az egész szervezetet átszövi, és nem kizárólag a csontvelőre korlátozódik.

A vérképzés „méhkirálynői" a hematopoietikus őssejtek, melyeket az önmegújulás, a proliferáció és a differenciálódás jellemez. Ezen funkciók által képesek létrehozni és fenntartani a vér összes sejtvonalát, válaszolni a hematopoiezist érő stresszhatásokra és regenerálni a csontvelőt. Az őssejteket tulajdonságaik és funkciójuk alapján két csoportba osztjuk: megkülönböztetjük a gyorsan osztódó, rövidtávú repopulációra képes STR sejteket, illetve a nyugalomban, G_0 fázisban lévő, hosszútávú repopulációra képes LTR sejteket. Kísérleteinkben a hisztamin szerepét vizsgáltuk ezen sejttípusok alapvető funkcióiban.

Igazoltuk a hisztamin termeléséért felelős enzim, a HDC expresszióját a különféle csontvelői őssejt-populációkban. A HDC és a hisztamin eltérő mértékben termelődött az egyes sejttípusokban, s ez jól korrelált a sejtek ciklusbeli aktivitásával.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy eltérés van a genetikailag hisztaminhiányos és a vad genotípusú egerek csontvelői sejtösszetételében: hisztamin hiányában alacsonyabb az őssejtek aránya. Ugyanakkor összességében a hisztaminhiányos génkiütött egerek vérképzése nyugalmi helyzetben nem szenved károsodást, a perifériás vérképük nem mutat eltérést a vad típusú egerekhez képest. A proliferációs és az ebből fakadó funkcionális különbségek csak a hematopoiezist érintő stresszhatásokra kerültek felszínre. A $HDC^{-/-}$ egerek csontvelő-regenerációja késlekedést mutatott, ami mögött a korai fázisban a CD34+ és az STR, késői fázisban pedig az LTR és a Ckit+ sejtek csökkenése állt. A hisztaminhiányos egerek károsodott csontvelő-regenerációját az őssejtek kisebb arányán kívül károsodott proliferációs képességük magyaráz, amit funkcionális, kolóniaformáló teszttel igazoltunk.

A regeneráció során kimutattuk a HDC és a hisztamin fokozott, de eltérő mértékű termelődését a különböző aktivitású sejtekben. Ezzel párhuzamosan fokozódott a hisztamin H1 és H2 receptorainak expressziója a csontvelőben. Vizsgálati modellünkben azonban a legújabban felfedezett, H4 receptor csökkent expresszióját tapasztaltuk a csontvelő-regeneráció során, ami megkérdőjelezi a H4R feltételezett kardinális szerepét a hematopoietikus sejtek funkcióiban.

Tanulmányunkban bizonyítottuk tehát, hogy a hisztamin befolyásolja a csontvelői sejtek osztódási képességét. Eredményeink alapján levonhattuk azt a következtetést, hogy a hisztamin szükséges a sejtek IL-3 stimulációra adott maximális proliferációs válaszához, mert hiányában a sejtosztódás elégtelennek bizonyult. Ennek hátterében megpróbáltuk felderíteni a hisztaminnak az IL-3 bonyolult jelátviteli útvonalaiban betöltött moduláló hatását. Kimutattuk, hogy a hisztamin hiánya negatívan befolyásolja az IL-3 jelátvitelét. Ez több szinten érvényesült, érintettek voltak az IL-3 receptorai, a termelődése, és az egyik kulcsmolekula, a STAT5 expressziója és foszforilációja is. A másik fő jelátviteli molekula, a MAPK1 expressziójában azonban *in vivo* nem találtunk különbségeket hisztamin hiányában, ami felvetette egyéb kompenzáló hatások érvényesülését ebben a komplex rendszerben. Vizsgálati eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a hisztamin elengedhetetlen az IL-3-nak a STAT5 aktivációján keresztül érvényesülő teljes hatásához.

Megállapítottuk, hogy hisztamin hiányában az osztódó, aktívan ciklusban lévő sejtekben a G_1-S átmenet lelassul, ezáltal a differenciálódási folyamatok kerülnek előtérbe. E mechanizmus mögött is feltételezhető a STAT5 hatásának károsodása a $HDC^{-/-}$ egerekben.

A csontvelői ős- és progenitorsejteknek nemcsak az osztódását, hanem a differenciálódási folyamatait is befolyásolja a hisztamin. Kolóniaformáló assay-vel kimutattuk, hogy hisztamin hiányában az eritroid és a mieloid sejtvonal érése szenved károdosást. Azonban ez csak a progenitorok szintjén érvényesül, az érett sejtvonalakban nem mutatkozik már ez az elmaradás.

Tanulmányunkban összehasonlítottuk a csontvelői regenerációt a lépben zajló extramedulláris vérképzéssel. Igazoltuk, hogy míg a csontvelőben a hisztaminnak inkább a direkt, őssejtek proliferációjára gyakorolt hatásai érvényesülnek, addig a lépben a hisztamin indirekt mechanizmusokon, környezeti és immunológiai hatásokon

keresztül befolyásolja a progenitorok osztódását. Kifejtettük a regulátoros T-sejtek és a dendritikus sejtek központi szerepét ezekben a folyamatokban, valamint rávilágítottunk a hisztaminnak a dendritikus sejtek funkcióira gyakorolt hatására. Ezáltal átmenetileg hatékonyabb regenerációt láttunk a $HDC^{-/-}$ egerek lépében, azonban a hisztamin direkt, osztódást befolyásoló hatásának hiánya a sejtekben a késői fázisban ugyanúgy elmaradást okoz az extramedulláris vérképzésben is. Levontuk továbbá azt a következtetést, hogy a lépben jobban érvényesül a hisztaminnak a mieloid differenciálódásban játszott szerepe.

Kísérleteinkkel tehát igazoltuk, hogy a hisztamin valóban befolyásolja a sejtosztódást, ám hiányában a sejtek válasza eltolódik a sejtpusztulás irányába. Bemutattuk, hogy mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* rendszerekben, a hisztamin hiányában a vérképző sejtek apoptóziskészsége fokozódik. Ezt a hisztamin szintézisének gátlásával is igazoltuk vad genotípusú sejtekben. Azonban a felszíni H1 és H2 receptorok blokkolása nem okozott fokozott apoptózist a sejtekben, ami egyéb receptoriális illetve jelátviteli kölcsönhatásokat feltételez.

Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálati eredményeinkkel *in vivo* és *in vitro* bizonyítékokkal is szolgáltunk a hisztaminnak a csontvelői őssejtek életében betöltött alapvető szerepét illetően. A hisztamin valószínűleg közvetett módon befolyásolja a sejtek osztódását, azáltal, hogy az osztódással kapcsolatos folyamatokba, úgymint a sejtciklus szabályozásába, illetve a növekedési faktorok jelátviteli útvonalaiba avatkozik bele. Mivel azonban komplex szabályozási rendszerről van szó, nyugalmi helyzetben a hisztamin hiányában ezek a moduláló hatások kompenzálódnak, és nem okoznak látványos eltérést. Stresszhatásra azonban a hibás rendszer már nem képes fiziológiás reakcióra, amikor a kompenzáló mechanizmusok is kimerülnek. A hisztamin tehát egy túlélési faktor, amely finoman regulálja az őssejtek életét, egyensúlyozza reakcióikat a sejtosztódás és a sejtpusztulás között.

Nem csak az alapkutatásban lehet érdekes a hisztamin szerepe a csontvelőben. A csontvelőt érintő kóros folyamatok kapcsán szintén felmerül a hisztaminnak az őssejteket befolyásoló képessége. A klinikumban már eddig is történtek próbálkozások a hisztamin pozitív hatásainak elősegítésére illetve negatív hatásainak kivédésére. A csontvelő hosszútávú depresszióját okozó sugárbalesetek, illetve kemo- és sugárterápiás

beavatkozások következtében kialakuló kórállapotokban már korábban is felmerült a hisztamin adásának létjogosultsága. Bizonyos akut mieloid leukémiákban már alkalmaznak hisztamint a regeneráció elősegítése céljából, egyelőre kísérleti jelleggel[210-212]. Hozzá kell tenni, hogy a sugárbalesetek esetében, amikor a szervezetet nagy dózisú röntgen- vagy gamma-sugárzás éri, akkor az expozíciót közvetlenül követő jelentős gyulladásos reakciók és az általuk okozott további csontvelő-károsodás kivédésére a katasztrófa orvostanban az antihisztaminok adásával számos esetben próbálkoztak a szakirodalom szerint[215].

Dolgozatunkban igazoltuk a hisztamin moduláló szerepét a csontvelői őssejtek osztódásában. Ezek az eredmények kapcsán felmerül továbbá a hisztamin hatás gátlásának lehetősége a progenitorokat és őssejteket érintő malignus sejtproliferációs kórképekben, a leukémiákban. Ezt támasztják alá azok a vizsgálatok, melyekben leukémiás sejtvonalakban mutatták ki a hisztamin kóros mértékű termelődését[177,183]. Továbbá arra is történtek próbálkozások, hogy leukémiás sejtek osztódását gátolják antihisztaminokkal[156].

Természetesen ezek és a dolgozatunkban bemutatott eredmények további vizsgálatokat igényelnek annak érdekében, hogy jobban feltérképezzük a mechanizmusokat, amelyek révén a hisztamin és a HDC befolyásolja a csontvelői vérképző sejtek élettanát. Ezek az ismeretek potenciálisan felhasználhatók lehetnek arra, hogy adott esetben a csontvelő-szuppressziót követő károsodásokat kivédhessük, és a regenerációt elősegíthessük, illetve a daganatos sejtek osztódását gátolhassuk.

Összefoglaló

A vérképzés igen összetett rendszer, melyet számos érett és éretlen sejttípus, valamint az élettani folyamataikat szabályozó intercelluláris kapcsolatok és szolubilis faktorok, citokinek hálózata alkot. A vérképzés valamennyi sejtje egy közös előalakból, a hematopoietikus őssejtből fejlődik ki, melynek jellemző funkciói az önmegújuló képesség, az osztódás és a differenciálódás. E funkciók által képesek létrehozni és fenntartani a vér összes sejtvonalát, illetve reagálni a hematopoiezist érő stresszhatásokra és regenerálni a csontvelőt. Tanulmányunkban a hisztamin szerepét vizsgáltuk a vérképzőrendszer progenitor-, és őssejtjeiben. Először is igazoltuk a HDC enzim és a hisztamin expresszióját a különféle csontvelői őssejt-populációkban, melyek eltérő mértékben mutattak HDC- és hisztamintermelést, összefüggésben ciklusbeli aktivitásukkal. Kísérleteinkben továbbá kimutattuk, hogy bár eltérés van a genetikailag hisztaminhiányos ($HDC^{-/-}$) egerek csontvelői őssejtarányában, összességében a vérképzésük nyugalmi helyzetben nem szenved károsodást. Ugyanakkor bizonyítottuk, hogy a hisztamin befolyásolja a csontvelői sejtek osztódási képességét, így hematopoietikus stresszhatásra az őssejtek károsodott proliferációs funkcióinak következtében elmarad a hisztaminhiányos egerek csontvelő-regenerációja. A károsodott őssejtfunkciók hátterében megpróbáltuk felderíteni a hisztaminnak az IL-3, mint az egyik legfőbb őssejt-szabályozó faktor, jelátviteli útvonalaiban betöltött moduláló hatását. Kimutattuk, hogy a hisztamin hiánya negatívan befolyásolja az IL-3 jelátvitelét, mégpedig az elégtelen STAT5 aktiváció által. Összefüggésbe hoztuk ezzel azt a megfigyelésünket, miszerint $HDC^{-/-}$ egerek osztódó sejtjeiben a G_1-S átmenet lelassul, ezáltal a differenciálódási folyamatok kerülnek előtérbe. Tanulmányunkban a továbbiakban bemutattuk, hogy míg a csontvelőben a hisztaminnak inkább a direkt, őssejtek proliferációjára gyakorolt hatása érvényesül, addig a lépben indirekt mechanizmusokon, környezeti és immunológiai hatásokon keresztül befolyásolja a progenitorok osztódását. Kísérleteinkkel végezetül igazoltuk, hogy a hisztamin hiányában a vérképző sejtek apoptóziskészsége fokozódik. Összegezve, vizsgálati eredményeinkkel bebizonyítottuk, hogy a hisztamin alapvető szerepet tölt be a vérképzés szabályozásában. Valószínűleg közvetett módon befolyásolja a vérképző őssejtek élettanát azáltal, hogy az osztódással kapcsolatos folyamatokba, úgymint a sejtciklus szabályozásába, illetve a növekedési faktorok jelátviteli útvonalaiba avatkozik bele. Eredményeink hozzájárulhatnak a vérképző őssejtek élettanának és az őket befolyásoló komplex citokinhálózat finom szabályozásának megértéséhez. Ezek az ismeretek potenciálisan felhasználhatók lehetnek a klinikumban, a csontvelőt érintő kóros folyamatok kezelésében.

Summary

Hematopoiesis is a complex system, that consists of various mature and immature cell populations, regulated by a network of intercellular connections and soluble factors. All hematopoietic cells originate from a common precursor, the hematopoietic stem cell, characterized by the ability to self-regenerate, proliferate and differentiate. By these functions, they can establish all hematopoietic cell lineages, and react to hematopoietic stress by complete bone marrow regeneration. In the present study we analyzed the role of histamine in the functions of hematopoietic stem and progenitor cells. First, we demonstrated the expression of HDC enzyme and histamine in the various stem cell subtypes. These cell populations showed a differential HDC and histamine production, correlating with their cycling status. We showed that there were defects in both the numbers and repopulative functions of stem cells in genetically histamine-free ($HDC^{-/-}$) mice. Although no marked alterations were noted in the overall steady-state hematopoieis, regeneration after hematopoietic stress was delayed in histamine-free mice. To discover the underlying mechanisms of impaired stem cell functions, we investigated the modulating effect of histamine in the signaling pathways of IL-3, one of the most important stem cell regulating factors. Our results showed that the lack of histamine negatively affects IL-3 signaling, through impaired activation of STAT5. Correlating with this, we observed a lag in G_1-S-phase progression in proliferating cells of $HDC^{-/-}$ mice, suggesting that histamine affects cell cycle entry and consequent differentiation processes. We also demonstrated that while histamine affects bone marrow cells by directly regulating their proliferation, in the spleen it exerts its immunomodulatory effect on other indirect regulatory mechanisms as well, thereby affecting extramedullary hematopoiesis. Finally, we proved that absence of histamine results in increased apoptosis of hematopoietic cells. Summarizing, these studies provide evidence that histamine has a fundamental role in regulation of hematopoiesis. This effect is probably exerted through interacting with proliferation processes, such as cell cycle regulation, and with signaling pathways of growth factors. Our results may contribute to a better understanding of the physiology of hematopoietic stem cells and their sophisticated regulation by a complex cytokine network. This knowledge could be potentially used in treating pathological bone marrow processes.

Irodalomjegyzék

1. Falus A. Az immunológia élettani és molekuláris alapjai. *Semmelweis, Bp*. 1996:37-43.

2. Bond VP, Fliedner TM, Archambeau JO. Mammalian Radiation Lethality - A Disturbance In Cellular Kinetics. *Academic Press, New York and London*. 1965.

3. Hendry JH, Lord BI. The analysis of the early and late response to cytotoxic insults in the haemopoietic cell hierarchy. In: Potten CS, Hendry JH, editors. Cytotoxic Insult to Tissue - Effects on Cell Lineages. *Churchill Livingstone, Edinburgh.* 1983:1-67.

4. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112:3543-3553.

5. Nakano T. Hematopoietic stem cells: generation and manipulation. *Trends Immunol*. 2003;24:589-594.

6. Ogawa M. Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood.* 1993;81:2844-2853.

7. Ikehara S. Pluripotent Hemopoietic Stem Cells in Mice and Humans. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;223:149-155.

8. Abkowitz JL, Golinelli D, Harrison DE, Guttorp P. In vivo kinetics of murine hemopoietic stem cells. *Blood.* 2000;96:3399-3405.

9. Domen J. The role of apoptosis in regulating hematopoietic stem cell numbers. *Apoptosis.* 2001;6:239–252.

10. Roeder I, Kamminga LM, Braesel K, Dontje B, de Haan G, Loeffler M. Competitive clonal hematopoiesis in mouse chimeras explained by a stochastic model of stem cell organization. *Blood*. 2005;105:609-616.

11. Muller-Sieburg CE, Sieburg HB. The GOD of Hematopoietic Stem Cells - A Clonal Diversity Model of the Stem Cell Compartment. *Cell Cycle*. 2006;5:394-398.

12. Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, Eaves, CJ, Muller-Sieburg, CE. The hematopoietic stem cell compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood*. 2006;107:2311-2316.

13. Weksberg DC, Chambers SM, Boles NC, Goodell MA. CD150 negative Side Population cells represent a functionally-distinct population of long-term hematopoietic stem cells. *Blood*. 2008;111:2444-2451.

14. McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, Wang JCY, Dick JE. Individual stem cells with highly variable proliferation and self-renewal properties comprise the human hematopoietic stem cell compartment. *Nat Immunol*. 2006;7:1225-1233.

15. Suda T, Arai F, Hirao A. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol.* 2005;26:426-433.

16. Fliedner TM. Blood stem cell transplantation: from preclinical to clinical models. *Stem Cells.* 1995;13:1-12.

17. Ricci-Vitiani L, Pagliuca A, Palio E, Zeuner A, De Maria R. Colon cancer stem cells. *Gut*. 2008;57:538-548.

18. Till JE, McCullogh EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964;51:29-36.

19. Heike T, Nakahata T. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1592:313– 321.

20. Doyle A, Griffiths JB, Newell DG. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures. John Wiley and Sons Ltd, England. 1998.

21. Eaves C, Miller C, Cashman J, Conneally I, Petzer A, Zandstra P, Eaves A, Kaushansky K, Moore MAS, Dick JE, Lansdorp PM. Hematopoietic stem cells: Inferences from in vivo assays. *Stem Cells*. 1997;15:1-5.

22. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, van Beurden CA, Baert MR, Chan PL. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood*. 1991;78:2527-2533.

23. Thoma SJ, Lamping CP, Ziegler BL. Phenotype analysis of hematopoietic CD34+ cell populations derived from human umbilical cord blood using flow cytometry and cDNA-polymerase chain reaction. *Blood.* 1994;83:2103-2114.

24. Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC. Mouse cell surface antigens: Nomenclature and Immunophenotyping. *J. Immun*. 1998;160:3861-3868.

25. Sprangrude GJ, Smith L, Uchida N, Ikuta K, Heimfeld S, Friedman J, Weissman IJ. Mouse hematopoietic stem cells. *Blood*. 1991; 78:1395-1402.

26. Sprangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241:58-62.

27. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly-discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*. 1998;4:1038-1045.

28. Guo Y, Lubbert M, Engelhardt M. CD34- Hematopoietic Stem Cells: Current Concepts and Controversies *Stem Cells*. 2003;21:15-20.

29. Van Zant G. Stem cell markers: less is more! *Blood*. 2006;107:855-856.

30. Ogawa M.Changing phenotypes of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2002;30:3–6.

31. Doi H, Inaba M, Yamamoto Y, Taketani S, Mori S, Sugihara A, Ogata H, Toki J, Hisha H, Inaba K, Sogo S, Adachi M, Matsuda T, Good RA, Ikehara S. Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit<low. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2513-2517.

32. Charbord P. Hemopoietic stem cells: analysis of some parameters critical for engraftment. *Stem Cells.* 1994;12:545-562.

33. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner S, Mulligan RC. Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are Replicating In Vivo. *J Exp Med*. 1996;183:1797-1806.

34. Lemoli RM, Tafuri A, Fortuna A, Petrucci MT, Ricciardi MR, Catani L, Rondelli D, Fogli M, Leopardi G, Ariola C, Tura S. Cycling status of CD34+ cells mobilized into peripheral blood of healthy donors by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1997;89:1189-1196.

35. Graf L, Heimfeld S, Torok-Storb B. Comparison of gene expression in CD34+ cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood by high-density oligonucleotide array analysis. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7:486-494.

36. Brandt JE, Bhalla K, Hoffman R. Effects of interleukin-3 and c-kit ligand on the survival of various classes of human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1994;83:1507-1514.

37. Zhao Y, Lin Y, Zhan Y, Yang G, Louie J, Harrison DE, Anderson WF. Murine hematopoietic stem cell characterisation and its regulation in BM transplantation. *Blood*. 2000; 96:3016-3022.

38. Osawa M. Nakamura K. Nishi N. Takahasi N. Tokuomoto Y. Inoue H. Nakauchi H. In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 1996;156:3207-3214.

39. Barclay AN. The Leucocyte Antigen - Facts Book. *Academic Press, London*. 1997.

40. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30:973–981.

41. Jiang H, Sugimoto K, Sawada H, Takashita E, Tohma M, Gonda H, Mori KJ. Mutual education between hematopoietic cells and bone marrow stromal cells

through direct cell-to-cell contact: factors that determine the growth of bone marrow stroma-dependent leukemic (HB-1) cells. *Blood*. 1998;92:834-841.

42. Burger JA, Spoo A, Dwenger A, Burger M, Behringer D. CXCR4 chemokine receptors (CD184) and alpha4beta1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34+ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *Br J Haematol*. 2003;122:579-589.

43. Nothdurft W. Bone marrow. In: Scherer E, Streffer C, Trott KR, editors. Medical Radiology. Radiopathology of Organs and Tissues. *Springer-Verlag, Berlin.* 1991:113-169.

44. Snow JW, Abraham N, Ma MC, Abbey NW, Herndier B, Goldsmith MA. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2002;99:95-101.

45. Vermeulen M, Le Pesteur F, Gagnerault MC, Mary JY, Sainteny F, Lepault F. Role of adhesion molecules in the homing and mobilisation of murine hemopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1998;92:894-900.

46. Mohle R, Moore MAS, Nachman RL, Rafii S. Transendothelial Migration of CD34 " and Mature Hematopoietic Cells: An In Vitro Study Using a Human Bone MarrowEndothelial Cell Line. *Blood*.,1997;89:72-80.

47. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MAS, Werb Z, Rafii S. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell*. 2002;109:625–637.

48. Scott LM, Priestley GV, Papayannopoulou T. Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol Cell Biol.* 2003;23:9349-9360.

49. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. Antibodies to VLA4 Integrin Mobilize Long-Term Repopulating Cells and Augment Cytokine-Induced Mobilization in Primates and Mice. *Blood*. 1997;90:4779-4788.

50. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*. 1989;339:27-30.

51. Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*. 2000;19:2532-2547.

52. Itoh Y, Ikebuchi K, Hirashima K. Interleukin-3 and granulocyte colony-stimulating factor as survival factors in murine hemopoietic stem cells in vitro. *Int J Hematol*. 1992;55:139-145.

53. Selvakumaran M, Liebermann DA, Hoffman-Liebermann B. Deregulated c-myb disrupts interleukin-6- or leukemia inhibitory factor-induced myeloid differentiation prior to c-myc: role in leukemogenesis. Mol Cell Biol. 1992 Jun;12(6):2493-500.

54. Fioredda F, Calvillo M, Lanciotti M, Lanza T, Giunti L, Castagnola E, Lorenzi I, Tonelli R, Ghezzi P, Dufour C. Pegfilgrastim in children with severe congenital neutropenia. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54:465-467.

55. Battiwalla M, McCarthy PL. Filgrastim support in allogeneic HSCT for myeloid malignancies: a review of the role of G-CSF and the implications for current practice. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43:351-356.

56. Dunbar CE, Smith DA, Kimball J, Garrison L, Nienhuis AW, Young NS. Treatment of Diamond-Blackfan anaemia with haematopoietic growth factors, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: sustained remissions following IL-3. *Br J Haematol*. 1991;79:316-321.

57. Ganser A, Lindemann A, Seipelt G, Ottmann OG, Herrmann F, Eder M, Frisch J, Schulz G, Mertelsmann R, Hoelzer D. Effects of recombinant human interleukin-3 in patients with normal hematopoiesis and in patients with bone marrow failure. *Blood*. 1990;76:666-676.

58. Wognum AW, Visser TP, de Jong MO, Egeland T, Wagemaker G. Differential Expression of Receptors for Interleukin-3 on Subsets of CD34-Expressing Hematopoietic Cells of Rhesus Monkeys. *Blood.* 1995;86:581-591.

59. Katayama N, Clark SC, Ogawa M. Growth Factor Requirement for Survival in Cell-Cycle Dormancy of Primitive Murine Lymphohematopoietic Progenitors. *Blood.* 1993;81:610-616.

60. Ghinassi B, Verrucci M, Jelicic K, Di Noia A, Migliaccio G, Migliaccio AR. Interleukin-3 and erythropoietin cooperate in the regulation of the expression of erythroid-specific transcription factors during erythroid differentiation. *Exp Hematol*. 2007;35:735–747.

61. van Dijk TB, Baltus B, Caldenhoven E, Handa H, Raaijmakers JAM, Lammers JWJ, Koenderman L, de Groot RP. Cloning and Characterization of the Human Interleukin-3 (IL-3)/IL-5/Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor bc Gene: Regulation by Ets Family Members. *Blood*. 1998;92:3636-3646.

62. Bagley CJ, Woodcock JM, Stomski FC, Lopez AF. The Structural and Functional Basis of Cytokine Receptor Activation: Lessons From the Common b Subunit of the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Interleukin-3 (IL-3), and IL-5 Receptors. *Blood*. 1997;89:1471-1482.

63. Nishinakamura R, Miyajima A, Mee PJ, Tybulewicz VL, Murray R. Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions. *Blood*. 1996;88:2458-2464.

64. Robb L, Drinkwater CC, Metcalf D, Li R, Köntgen F, Nicola NA, Begley CG. Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:9565-9569.

65. Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y, Shimoda K, Minoguchi M, Akira S, Tanaka M, Miyajima A, Kitamura T, Nakauchi H. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med*. 2005;202:169-179.

66. Igaz P, Tóth S, Falus A. Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflamm res*. 2001;50:435–441.

67. Mui AL, Wakao H, Kinoshita T, Kitamura T, Miyajima A. Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation. *EMBO J*. 1996;15:2425-2433.

68. Bunting KD, Bradley HL, Hawley TS, Moriggl R, Sorrentino BP, Ihle JN. Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. *Blood*. 2002;99:479-487.

69. Moore MA, Dorn DC, Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G. Constitutive activation of Flt3 and STAT5A enhances self-renewal and alters differentiation of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2007;35:105-116.

70. Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G, Moore MA. Constitutive activation of STAT5A promotes human hematopoietic stem cell self-renewal and erythroid differentiation. *J Exp Med.* 2004;200:623-635.

71. Bradley HL, Hawley TS, Bunting KD. Cell intrinsic defects in cytokine responsiveness of STAT5-deficient hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002;100:3983-3989.

72. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998; 93:841-850.

73. Dai X, Chen Y, Di L, Podd A, Li G, Bunting KD, Hennighausen L, Wen R, Wang D. Stat5 is essential for early B cell development but not for B cell maturation and function. *J Immunol*. 2007;179:1068-1079.

74. Li G, Wang Z, Zhang Y, Kang Z, Haviernikova E, Cui Y, Hennighausen L, Moriggl R, Wang D, Tse W, Bunting KD. STAT5 requires the N-domain to maintain hematopoietic stem cell repopulating function and appropriate lymphoid-myeloid lineage output. *Exp Hematol*. 2007;35:1684-1694.

75. Dobbin E, Graham C, Corrigan PM, Thomas KG, Freeburn RW, Wheadon H. Tel/PDGFRbeta induces stem cell differentiation via the Ras/ERK and STAT5 signaling pathways. *Exp Hematol*. 2009;37:111-121.

76. Shen S, Passioura T, Symonds G, Dolnikov A. N-ras oncogene-induced gene expression in human hematopoietic progenitor cells: upregulation of p16INK4a and p21CIP1/WAF1 correlates with myeloid differentiation. *Exp Hematol*. 2007;35:908-919.

77. Ke J, Gururajan M, Kumar A, Simmons A, Turcios L, Chelvarajan RL, Cohen DM, Wiest DL, Monroe JG, Bondada S. The Role of MAPKs in B Cell Receptor-induced Down-regulation of Egr-1 in Immature B Lymphoma Cells. *J Biol Chem*. 2006;281:39806–39818.

78. Brivanlou AH, Darnell JE. Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science.* 2002;295:813-818.

79. Gu J, Zhang QH, Huang QH, Ren SX, Wu XY, Ye M, Huang CH, Fu G, Zhou J, Niu C, Han ZG, Chen SJ, Chen Z. Gene expression in CD34(+) cells from normal bone marrow and leukemic origins. *Hematol J*. 2000;1:206-217.

80. Manfredini R, Zini R, Salati S, Siena M, Tenedini E, Tagliafico E, Montanari M, Zanocco-Marani T, Gemelli C, Vignudelli T, Grande A, Fogli M, Rossi L, Fagioli ME, Catani L, Lemoli RM, Ferrari S. The kinetic status of hematopoietic stem cell subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment, and engraftment. *Stem Cells*. 2005; 23: 496-506.

81. Terskikh AV, Miyamoto T, Chang C, Diatchenko L, Weissman IL. Gene expression analysis of purified hematopoietic stem cells and committed progenitors. *Blood.* 2003;102:94-101.

82. Sung Ly, Gao S, Shen H, Yu H, Song Y, Smith SL, Chang CC, Inoue K, Kuo L, Lian J, Li A, Tian XC, Tuck DP, Weissman SM, Yang X, Cheng T. Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Gen*. 2006;38:1323-1328.

83. Stein MI, Zhu J, Emerson SG. Molecular pathways regulating the self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2004; 32:1129-1136.

84. Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene*. 2004;23:7223–7232.

85. Dai JM, Sun DC, Lin RX, Yang J, Lou S, Wang SQ. Microarray analysis of differentially expressed genes in mouse bone marrow tissues after ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 2006;82:511-521.

86. Jen KY, Cheung VG. Transcriptional response of lymphoblastoid cells to ionizing radiation. *Gen Res*. 2003;13:2092-2100.

87. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, Goodell MA. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*. 2004;2:e301.

88. Dainiak N. Recent advances in radiation effects, hematopoiesis, and malignancy. *Exp Hematol*. 2007;35:1–4.

89. Sattler M, Winkler T, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Salgia R, Griffin JD. Hematopoietic Growth Factors Signal Through the Formation of Reactive Oxygen Species. *Blood*. 1999;93,2928-2935.

90. Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol*. 2002;30:513-528.

91. Drouet M, Mourcin F, Grenier N, Leroux V, Denis J, Mayol JF, Thullier P, Lataillade JJ, Herodin F. Single administration of stem cell factor, FLT-3 ligand, megakaryocyte growth and development factor, and interleukine-3 in combination soon after irradiation prevents nonhuman primates from myelosuppression: lond-term follow-up of hematopoiesis. *Blood*. 2004;103:878-885.

92. McCarthy KF: Population size and radiosensitivity of murine hemopoietic endogeneous long-term repopulating cells. *Blood.* 1997;89, 834-841.

93. Scheding S, Media JE, KuKuruga MA, Nakeff A. In situ radiation sensitivity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-recruited murine circulating blood and bone marrow progenitors (colony-forming unit [CFU]-granulocyte-macrophage and CFU-megakaryocyte): evidence for possible biologic differences between mobilized blood and bone marrow. *Blood*. 1996;88:472-478.

94. Rieger KE, Chu G. Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells. *Nucl Acids Res*. 2004;32:4786–4803.

95. Domen J, Weissman IL. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other. *J Exp Med*. 2000;192:1707-1718.

96. Peták I. Halálreceptorok, halálligandok. In: Kopper L, Fésüs L, editors. Apoptózis. *Medicina, Budapest*, 2002:63-100.

97. Schneider E, Tonanny MW, Lisbonne M, Leite-de-Moraes M, Dy M. Pro-Th1 cytokines promote Fas-dependent apoptosis of immature peripheral basophils. *J Immunol*. 2004;172:5262-5268.

98. Kim H, Whartenby KA, Georgantas III RW, Wingard J, Civin CI. Human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells express high levels of FLIP and are resistant to fas-mediated apoptosis. *Stem Cells*. 2002;20:174-182.

99. Sato T, Selleri C, Anderson S, Young NS, Maciejewski JP. Expression and modulation of cellular receptors for interferon-gamma, tumour necrosis factor, and Fas on human bone marrow CD34+ cells. *Br J Haematol*. 1997;97:356-365.

100. Belka C, Schmid B, Marini P, Durand E, Rudner J, Faltin H, Bamberg M, Schulze-Osthoff K, Budach W. Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene*. 2001;20:2190-2196.

101. Reap EA, Roof K, Maynor K, Borrero M, Booker J, Cohen PL. Radiation and stress-induced apoptosis: A role for fas/fas ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:5750-5755.

102. Booker JK, Reap EA, Cohen PL. Expression and function of Fas on cells damaged by gamma-irradiation in B6 and B6/lpr mice. *J Immunol*. 1998;161:4536-4541.

103. Strasser-Wozak EM, Hartmann BL, Geley S, Sgonc R, Bock G, AJ Santos, Hattmannstorfer R, Wolf H, Pavelka M, Kofler R. Irradiation induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in p53-deficient lymphoblastic leukemia cells without affecting Bcl-2 and Bax expression. *Cell Death Differ*. 1998;5:687-693.

104. Silva A, Wyllie A, Collins MKL. p53 Is Not Required for Regulation of Apoptosis or Radioprotection by Interleukin-3. *Blood.* 1997; 89:2717-2722.

105. Herodin F. Bourin P. Mayol JF. Lataillade JJ. Drouet M. Short-term injection of antiapoptotic cytokine combinations soon after lethal gamma -irradiation promotes survival. *Blood*.. 2003;101:2609-2616.

106. Lu L, Heinrich MC, Wang L, Dai M, Zigler AJ, Chai L, Broxmeyer HE. Retroviral-Mediated Gene Transduction of c-kit Into Single Hematopoietic Progenitor Cells From Cord Blood Enhances Erythroid Colony Formation and Decreases Sensitivity to Inhibition by Tumor Necrosis Factor and Transforming Growth Factor beta1. *Blood.* 1999;94:2319-2332.

107. Rinaudo MS, Su K, Falk LA, Halder S, Mufson RA. Human interleukin-3 receptor modulates bcl-2 mRNA and protein levels through protein kinase C in TF-1 cells. *Blood.* 1995;86: 80-88.

108. Perkins GR, Marshall CJ, Collins MK. The role of MAP kinase kinase in interleukin-3 stimulation of proliferation. *Blood.* 1996;87:3669-3675.

109. Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen SEW. Ability of Early Acting Cytokines to Directly Promote Survival and Suppress Apoptosis of Human Primitive CD34+CD38- Bone Marrow Cells With Multilineage Potential at the Single-Cell Level: Key Role of Thrombopoietin. *Blood.* 1997;90:2282-2292.

110. Peters R, Leyvraz S, Perey L. Apoptotic Regulation in Primitive Hematopoietic Precursors. *Blood.* 1998;92:2041-2052.

111. Hopewell JW. Radiation effects on vascular tissue. In: Potten CS, Hendry JH, editors. Cytotoxic Insult to Tissue - Effects on Cell Lineages. *Churchill Livingstone, Edinburgh*. 1983:228-258.

112. Gaugler MH, Squiban C, Claraz M, Schweitzer K, Weksler B, Gourmelon P, Van-der-Meeren A. Characterization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation. *Br J Haematol*. 1998;103:980-989.

113. Mazo IB, Quackenbush EJ, Lowe JB, von Andrian UH. Total body irradiation causes profound changes in endothelial traffic molecules for hematopoietic progenitor cell recruitment to bone marrow. *Blood*. 2002;99:4182-4191.

114. Gaugler MH, Squiban C, Mouthon MA, Gourmelon P, van-der-Meeren A. Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells. *Br J Haematol*. 2001;113:940-950.

115. Anderson RE, Standefer JC. Radiation injury in the immune system. In: Potten CS, Hendry JH, editors. Cytotoxic Insult to Tissue - Effects on Cell Lineages. *Churchill Livingstone, Edinburgh*. 1983:67-104.

116. Wyatt JP, Sommers SC. Chronic Marrow Failure, Myelosclerosis and Extramedullary Hematopoiesis. *Blood*. 1950;5:329-347.

117. Khaldoyanidi S, Sikora L, Broide DH, Rothenberg ME, Sriramarao P. Constitutive overexpression of IL-5 induces extramedullary hematopoiesis in the spleen. *Blood*. 2003;101:863-868.

118. Gerber GB, Maes J. Stem cell kinetics in spleen and bone marrow after single and fractionated irradiation of infant mice. *Radiat Environ Biophys*. 1980;18:249-256.

119. Schneider E, Moreau G, Arnould A, Vasseur F, Khodabaccus N, Dy M, Ezine S. Increased Fetal and Extramedullary Hematopoiesis in Fas-Deficient C57BL/6-*lpr/lpr* Mice. *Blood*. 1999;94:2613-2621.

120. Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Miyamoto K, Akiyama H, Takaishi H, Morioka H, Nakamura T, Okada Y, Blobel CP, Toyama Y. Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. *J Immunol*. 2009;182:2093-2101.

121. Birnberg T, Bar-On L, Sapoznikov A, Caton ML, Cervantes-Barragán L, Makia D, Krauthgamer R, Brenner O, Ludewig B, Brockschnieder D, Riethmacher D, Reizis B, Jung S. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity*. 2008;29:986-997.

122. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.

123. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26:289-307.

124. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. 2000;1:199-205.

125. Pulendran B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res*. 2004;29:187-196.

126. Sporri R, Reis e Sousa. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*. 2005;6:163-170.

127. Caron G, Delneste Y, Roelandts E, Duez C, Bonnefoy JY, Pestel J, Jeannin P. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J Immunol*. 2001;167:3682-3686.

128. Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest*. 2001;108:1865-1873.

129. Idzko M, la Sala A, Ferrari D, Panther E, Herouy Y, Dichmann S, Mockenhaupt M, Di Virgilio F, Girolomoni G, Norgauer J. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:839-846.

130. Dunford PJ, O'Donnell N, Riley JP, Williams KN, Karlsson L, Thurmond RL. The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol*. 2006;176:7062-7070.

131. Szeberenyi JB, Pallinger E, Zsinko M, Pos Z, Rothe G, Orso E, Szeberenyi S, Schmitz G, Falus A, Laszlo V. Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol Lett*. 2001;76:175-182.

132. Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol*. 2002;23:255-263.

133. Falus A. Histamine, part of the metabolome. *Acta Biol Hung*. 2003;54:27-34.

134. Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzas E, Kovacs P, Csaba G, Kittel A, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A. Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Lett*. 2001;502:53-56.

135. Watanabe T, Ohtsu H. L-histidine decarboxylase as a probe in studies on histamine. *Chem Rec*. 2002;2:369-376.

136. Dy M, Schneider E. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:393-410.

137. Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of beta-iminazolylethylamine. *J Physiol*. 1910;41:318-344.

138. Akdis CA, Blaser K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:15-22.

139. Schneider E, Lemoine FM, Breton-Gorius J, Machavoine F, Arnould A, Cramer EM, Guichard J, Dy M. IL-3-induced coexpression of histidine decarboxylase, IL-4 and IL-6 mRNA by murine basophil precursors. *Exp Hematol*. 1999;27:1010-1018.

140. Schneider E, Pollard H, Lepault F, Guy-Grand D, Minkowski M, Dy M. Histamine-producing cell-stimulating activity: IL-3 and GM-CSF induce de novo synthesis of histidine-decarboxylase in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 1987;139:3710-3717.

141. Dy M, Arnould A, Lemoine FM, Machavoine F, Ziltener H, Schneider E. Hematopoietic progenitors and inteleukine-3-dependent cell lines synthetise histamine in response to calcium ionophore. *Blood.* 1996;87:3161-3169.

142. Barbry P, Champe M, Chassande O, Munemitsu S, Champigny G, Lingueglia E, Maes P, Frelin C, Tartar A, Ullrich A. Human kidney amiloride-binding protein: cDNA structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7347-7351.

143. Girard B, Otterness DM, Wood TC, Honchel R, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: cloning and expression of kidney cDNA. *Mol Pharmacol*. 1994;45:461-468.

144. Zhang X, McIntire WS. Cloning and sequencing of a copper-containing, topa quinone-containing monoamine oxidase from human placenta. *Gene*. 1996;179:279-286.

145. Bowsher RR, Verburg KM, Henry DP. Rat histamine N-methyltransferase. Quantification, tissue distribution, purification, and immunologic properties. *J Biol Chem*. 1983;258:12215-12220.

146. Novak I, Falus A. Molecular biology and role of histamine in physiological and pathological reactions. A review. *Acta Biol Hung*. 1997;48:385-394.

147. Jutel M, Blaser K, Akdis CA. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005;137:82-92.

148. Tanimoto A, Sasaguri Y, Ohtsu H. Histamine network in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:280-284.

149. Falus A, Hegyesi H, Lazar-Molnar E, Pos Z, Laszlo V, Darvas Z. Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol*. 2001;22:648-652.

150. Musio S, Gallo B, Scabeni S, Lapilla M, Poliani PL, Matarese G, Ohtsu H, Galli SJ, Mantegazza R, Steinman L, Pedotti R. A key regulatory role for histamine in experimental autoimmune encephalomyelitis: disease exacerbation in histidine decarboxylase-deficient mice. *J Immunol*. 2006;176:17-26.

151. Akdis CA, Simons FE. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol*. 2006;533:69-76.

152. Fung-Leung WP, Thurmond RL, Ling P, Karlsson L. Histamine H4 receptor antagonists: the new antihistamines? *Curr Opin Investig Drugs*. 2004;5:1174-1183.

153. Hegyesi H, Darvas Z, Thurmond R, Falus A. Histamine receptors and signaling. In: Damjanovich S, editor. Biophysical aspects of transmembrane signaling. *Springer, Heidelberg*. 2005:265-291.

154. Leurs R, Church MK, Taglialatela M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:489-498.

155. Togias A. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:S60-S68.

156. Radvany Z, Darvas Z, Kerekes K, Prechl J, Szalai C, Pallinger E, Valeria L, Varga VL, Sandor M, Erdei A, Falus A. H1 histamine receptor antagonist inhibits constitutive growth of Jurkat T cells and antigen-specific proliferation of ovalbumin-specific murine T cells. *Semin Cancer Biol.* 2000;10:41-45.

157. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*. 2001;413:420-425.

158. Inoue I, Yanai K, Kitamura D, Taniuchi I, Kobayashi T, Niimura K, Watanabe T, Watanabe T. Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:13316-13320.

159. Yanai K, Son LZ, Endou M, Sakurai E, Watanabe T. Targeting disruption of histamine H1 receptors in mice: behavioral and neurochemical characterization. *Life Sci*. 1998;62:1607-1610.

160. Del Valle J, Gantz I. Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol*. 1997;273:G987-G996.

161. Sakai K. Role of histamine H1-and H2-receptors in the cardiovascular system of the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1980;2:607-617.

162. Barocelli E, Ballabeni V. Histamine in the control of gastric acid secretion: a topic review. *Pharmacol Res*. 2003;47:299-304.

163. Torrent A, Moreno-Delgado D, Gomez-Ramirez J, Rodriguez-Agudo D, Rodriguez-Caso C, Sanchez-Jimenez F, Blanco I, Ortiz J. H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through calcium/calmodulin- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *Mol Pharmacol*. 2005;67:195-203.

164. Leurs R, Bakker RA, Timmerman H, de Esch IJ. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:107-120.

165. Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol*. 1999;55:1101-1107.

166. Gomez-Ramirez J, Ortiz J, Blanco I. Presynaptic H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through cAMP pathway. *Mol Pharmacol*. 2002;61:239-245.

167. Toyota H, Dugovic C, Koehl M, Laposky AD, Weber C, Ngo K, Wu Y, Lee DH, Yanai K, Sakurai E, Watanabe T, Liu C, Chen J, Barbier AJ, Turek FW, Fung-Leung WP, Lovenberg TW. Behavioral characterization of mice lacking histamine H(3) receptors. *Mol Pharmacol*. 2002;62:389-397.

168. Coge F, Guenin SP, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP. Structure and expression of the human histamine H4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:301-309.

169. de Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R. The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:462-469.

170. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305:1212-1221.

171. Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, Nguyen S, Riley JP, Sun S, Williams KN, Edwards JP, Karlsson L. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;309:404-413.

172. Dunford PJ, Williams KN, Desai PJ, Karlsson L, McQueen D, Thurmond RL. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:176-183.

173. Varga C, Horvath K, Berko A, Thurmond RL, Dunford PJ, Whittle BJ. Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2005;522:130-138.

174. Zhang M, Thurmond RL, Dunford PJ. The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacol Ther*. 2007;113:594-606.

175. Szeberenyi JB, Pallinger E, Todorova R, Falus A. Detection of histidine decarboxylase in peripheral blood leukocytes by flow cytometry. *Inflamm Res*. 1999;48:S87-S89.

176. Szeberenyi JB, Laszlo V, Pallinger E, Orso E, Rothe G, Schmitz G, Falus A. Intracellular histamine content increases during in vitro dendritic cell differentiation. *Inflamm Res*. 2001;50:S112-S113.

177. Dy M, Pacilio M, Arnould A, Machavoine F, Mayeux P, Hermine O, Bodger M, Schneider E. Modulation of histidine decarboxylase activity and cytokine synthesis in human leukemic cell lines: Relationship with basophilic and/or megakaryocytic differentiation. *Exp Hematol*. 1999;27:1295-1305.

178. Takamatsu S, Nakashima I, Nakano K. Modulation of endotoxin-induced histamine synthesis by cytokines in mouse bone marrow-derived macrophages. *J Immunol* 1996;156:778-85.

179. Hirasawa N, Shiraishi M, Tokuhara N, Hirano Y, Mizutani A, Mue S, Ohuchi K. Pharmacological analysis of the inflammatory exudate-induced histamine production in bone marrow cells. *Immunopharmacology.* 1997;36:87–94.

180. Corbel S, Schneider E, Lemoine FM, Dy M. Murine hematopoietic progenitors are capable of both histamine synthesis and uptake. *Blood*. 1995;86:531-539.

181. Corbel S, Dy M. Evidence for bidirectional histamine transport by murine hematopoietic progenitor cells. *FEBS Lett*. 1996;391:279-81..

182. Schneider E, Ploemacher RE, Nabarra B, Brons NHC, Dy M. Mast cells and their precursors are not required for interleukin-3-induced histamine synthesis in murine bone marrow: Characteristics of histamine-producing cells. *Blood*. 1993;81:1161-1169.

183. Malaviya R, Uckun FM. Histamine as an autocrine regulator of leukemic cell proliferation. *Leuk Lymphoma*. 2000;36:367-373.

184. Byron JW. Mechanism for histamine H2-receptor induced cell-cycle changes in the bone marrow stem cell. *Agents Actions*. 1977;7:209-213.

185. Lett-Brown MA, Kalman V, Klimpel GR. Histamine production by alloantigen-activated mouse bone marrow cells. *Cell Immunol*. 1984;87:53-64.

186. Veszely G, Furesz J, Pallinger E, Horkay B, Falus A. Effect of alpha-FMH and DPPE on colony-forming properties of human peripheral progenitor cells. *Curr Med Chem*. 2002;9:1349-1357.

187. Bencsath M, Gidali J, Szeberenyi J, Veszely G, Hegyi K, Falus A. Regulation of murine hematopoietic colony formation by histamine. *Inflamm Res*. 2000;49:S66-S67.

188. Nakane H. Sonobe Y. Watanabe T. Nakano K. Histamine: its novel role as an endogenous regulator of Con A-dependent T cell proliferation. *Inflamm Res*. 2004;53:324-328.

189. Nakaya N, Tasaka K. The influence of histamine on precursors of granulocytic leukocytes in murine bone marrow. *Life Sci*. 1988;42:999-1010.

190. László V, Rothe G, Hegyesi H, Szeberényi JB, Orsó E, Schmitz G, Falus A. Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role for endogenously synthesized histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflamm Res*. 2001;50:428-434.

191. Wang KY, Arima N, Higuchi S, Shimajiri S, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Sasaguri Y. Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages. *FEBS Lett*. 2000;473:345-348.

192. Wiener Z, Andrasfalvy M, Pallinger E, P Kovacs, Cs Szalai, A Erdei, S Toth, A Nagy, A Falus. Bone marrow-derived mast cell differentiation is strongly reduced in histidine decarboxylase knockout, histamine-free mice. *Int Immunol*. 2002;14:381-387.

193. Terszowski G, Waskow C, Conradt P, Lenze D, Koenigsmann J, Carstanjen D, Horak I, Rodewald HR. Prospective isolation and global gene expression analysis of the erythrocyte colony-forming unit (CFU-E). *Blood*. 2005;105:1937-1945.

194. Wagner W, Ansorge A, Wirkner U, Eckstein V, Schwager C, Blake J, Miesala K, Selig J, Saffrich R, Ansorge W, Ho AD. Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. *Blood*. 2004;104:675-686.

195. Kahlson G, Rosengren E. New approaches to the physiology of histamine. Physiol Rev. 1968;48:155.

196. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J*. 2006;20:2366-2368.

197. Kanda N, Watanabe S. Histamine enhances the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2004;122:863-872.

198. Tan M, Pan Z, Wang Q, Xu Y. Effects of different subtypes of histamine receptors on proliferation and differentiation of murine colony forming unit granulocyte-macrophage and colony forming unit megakaryocyte. *Chin Med J Engl*. 1998;111:132-135.

199. van Gils FCJM, van Teeffelen MEJM, Neelis KJ, Hendriks J, Burger H, van Leen RW, Knol E, Wagemaker G, Wognum AW. IL-3 treatment of Rhesus monkeys leads to increased production of histamine-releasing cells that express IL-3 receptors at high levels. *Blood.* 1995;86:592-597.

200. Lebel B, Schneider E, Piquet-Pellorce C, Machavoine F, Kindler V, Luffau G, Dy M. Antigenic challenge of immunized mice induces endogenous production of IL-3 that increases histamine synthesis in hematopoietic organs. *J Immun*. 1990;145:1222-1226.

201. Igaz P, Novak I, Lazar E, Horvath B, Heninger E, Falus A. Bidirectional communication between histamine and cytokines. *Inflamm res*. 2001;50:123–128.

202. Endo Y, Kikuchi T, Takeda Y, Nitta Y, Rikiishi H, Kumagai K. GM-CSF and G-CSF stimulate the synthesis of histamine and putrescine in the hematopoietic organs in vivo. *Immun Lett.* 1992;33:9-14.

203. Murata Y, Tanimoto A, Wang K, Masato T, Sasaguri Y, De Corte F, Matsushita H. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor increases the expression of histamine and histamine receptors in Monocytes/macrophages in relation to arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:430-435.

204. Mio M, Tasaka K. externalization of G-CSF receptor of murine bone marrow cells induced by histamine. *Ther Res.* 1995;16:236-243.

205. Piquet-Pellorce C, Schneider E, Dy M. GM-CSF in association with IL-1 triggers day-8 CFU-S into cell cycle: role of histamine. *J Cell Phys*. 1991;149:18-23.

206. Pacilio M, Debili N, Arnould A, Machavoine F, Rolli-Derkinderen M, Bodger M, Arock M, Dumenil D, Dy M, Schneider E. Thrombopoietin induces histidine decarboxylase gene expression in c-mpl transfected UT7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285:1095-1011.

207. Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, NakanishiK. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:13962-13966.

208. Yamaguchi K, Motegi K, Kurimoto M, Endo Y. Induction of the activity of the histamine-forming enzyme, histidine decarboxylase, in mice by IL-18 and by IL-18 plus IL-12. *Inflamm Res*. 2000;49:513–519.

209. Molnar EL, Hegyesi H, Toth S, Darvas Z, Laszlo V, Szalai C, Falus A. Biosynthesis of interleukin-6, an autocrine growth factor for melanoma, is regulated by melanoma-derived histamine. *Semin Cancer Biol.* 2000;10:25-28.

210. Mellqvist UH, Hansson M, Brune M, Dahlgren C, Hermodsson S, Hellstrand K. Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood*. 2000;96:1961-1968.

211. Brune M, Castaigne S, Catalano J, Gehlsen K, Ho AD, Hofmann WK, Hogge DE, Nilsson B, Or R, Romero AI, Rowe JM, Simonsson B, Spearing R, Stadtmauer EA, Szer J, Wallhult E, Hellstrand K. Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2006;108:88-96.

212. Hellstrand K, Hermodsson S, Naredi P, Mellqvist UH, Brune M. Histamine and cytokine therapy. *Acta Oncol*. 1998;37:347-353.

213. Hellstrand K, Mellqvist UH, Wallhult E, Carneskog J, Kimby E, Celsing F, Brune M. Histamine and interleukin-2 in acute myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1997;27:429-438.

214. Jeannin P, Delneste Y, Gosset P, Molet S, Lassalle P, Hamid Q, Tsicopoulos A. Tonnel AB. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. .*Blood.* 1994;84:2229-2233.

215. Mozdarani H. Radioprotective Properties of Histamine H2 Receptor Antagonists: Present and Future Prospects. *J Radiat Res.* 2003;44:145-149.

216. Medina VA, Croci M, Mohamad NA, Massari N, Garbarino G, Cricco GP, Núñez MA, Martín GA, Crescenti EJ, Bergoc RM, Rivera ES. Mechanisms underlying the radioprotective effect of histamine on small intestine. *Int J Radiat Biol*. 2007;83:653-63.

217. Medina V, Cricco G, Mohamad N, Croci M, Nunez M, Martin G, Cocca C, Bergoc R, Rivera E. Histamine is a selective protector against cellular damage produced by ionizing radiation. *Inflamm Res*. 2005;54: S17-S18.

218. Hiragun T, Morita E, Shindo H, Tanaka T, Kameyoshi Y, Okabe T, Kanno M, Yamamoto S. Altered in vitro apoptosis of cultured mast cells prepared from an inbred strain of mice, NC/Kuj. *Clin Exp Allergy*. 2000;30, 433-438.

219. Ben-Amor A, Schneider E, Arnould A, Machavoine F. Fas cross-linking mimics the inhibitory effect of anti-CD3 on IL-3-induced histamine and cytokine production by murine myeloid spleen cell precursors. *Exp Hematol*. 1998;26:903-909.

220. Jangi SM, Asumendi A, Arlucea J, Nieto N, Perez-Yarza G, Morales MC, de la Fuente-Pinedo M, Boyano MD. Apoptosis of Human T-Cell Acute

Lymphoblastic Leukemia Cells by Diphenhydramine, an H1 Histamine Receptor Antagonist. *Onc Res*. 2004;14:363-372.

221. Hanson WR, Fry RJ, Sallese AR, Frischer H, Ahmad T, Ainsworth EJ. Comparison of intestine and bone marrow radiosensitivity of the BALB/c and the C57BL/6 mouse strains and their B6CF1 offspring. *Radiat Res*. 1987;110:340-352.

222. Grahn D. Acute Radiation Response of Mice from a Cross between Radiosensitive and Radioresistant Strains. *Genetics*. 1958;43:835-843.

223. Mori N, Okumoto M, Yonezawa M, Nishikawa R, Takamori Y, Esaki K. Factors related to resistance to hematopoietic death in mice. *J Radiat Res (Tokyo*) 1994;35:1-10.

224. Pallinger E, Buzas E, Laszlo V, Watanabe T, Ohtsu H, Ichikawa A, Nagy A, Falus A. Characteristaion by flow cytometry of hemopoietic progenitors in bone marrow of histidine decarboxylase knock out and wild type mice. *Inflamm Res*. 2001;50:S89-S90.

225. Tanaka S, Ichikawa A. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: immune regulatory roles of histamine produced by leukocytes. *J Pharmacol Sci*. 2006;101:19-23.

226. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:1195-1200.

227. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:3120-3125.

228. Mor S, Nagler A, Barak V, Handzel ZT, Geller-Bernstein C, Fabian I. Histamine enhances granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*. 1995;58:445-450.

229. Poluektova LY, Khan MM. Protein kinase A inhibitors reverse histamine-mediated regulation of IL-5 secretion. *Immunopharmacology*. 1998;39:9–19.

230. Yao Z, Cui Y, Watford WT, Bream JH, Yamaoka K, Hissong BD, Li D, Durum SK, Jiang Q, Bhandoola A, Hennighausen L, O'Shea JJ. Stat5a_b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:1000–1005.

231. Hoelbl A, Kovacic B, Kerenyi MA, Simma O, Warsch W, Cui Y, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R, Sexl V. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood*. 2006;107:4898-4906.

232. Gardner RV. Oliver P. Astle CM. Stem cell factor improves the repopulating ability of primitive hematopoietic stem cells after sublethal irradiation (and, to a lesser extent) after bone marrow transplantation in mice. *Stem Cells*. 1998;16:112-119.

233. Antov A, Yang L, Vig M, Baltimore D, Van Parijs L. Essential Role for STAT5 Signaling in CD25+CD4+ Regulatory T Cell Homeostasis and the Maintenance of Self-Tolerance. ***J** Immunol*. 2003;171:3435–3441.

234. Kelly J, Spolski R, Imada K, Bollenbacher J, Lee S, Leonard WJ. A Role for Stat5 in CD8+ T Cell Homeostasis. *J Immunol*. 2003;170:210–217.

235. Mahnke K, Knop J, Enk AH. Induction of tolerogenic DCs: 'you are what you eat'. *Trends Immunol*. 2003;24:646-651.

236. Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett*. 2004;94:11-26.

237. Smits HH, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2005;26:123-129.

238. Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol*. 2003;24:36-43.

239. Tadmori W, Zhang M, Beavis AJ, Sullivan LM, Narula SK. Suppression of the allogeneic response by human IL-10: a critical role for suppression of a synergy between IL-2 and TNF-alpha. *Cytokine*. 1994;6:462-471.

Saját publikációk jegyzéke

A doktori dolgozat témájában írt közlemények listája:

1. Horvath Z, Pallinger E, Horvath G, Jelinek I, Falus A, Buzas EI. Histamine H1 and H2 receptors but not H4 receptors are upregulated during bone marrow regeneration. *Cell Immunol*. 2006;244:110-115. IF: 1,709

2. Horvath Z, Pallinger E, Horvath G, Jelinek I, Veszely G, Furesz J, Falus A, Buzas EI. Extramedullary hematopoiesis is dysregulated in histamine-free histidine decarboxylase knockout (HDC(-/-)) mice. *Inflamm Res*. 2010;59(6):429-436. IF: 1,457

3. Jelinek I, Laszlo V, Buzas E, Pallinger E, Hangya B, Horvath Z, Falus A. Increased antigen presentation and T(h)1 polarization in genetically histamine-free mice. *Int Immunol*. 2007;19(1):51-58. IF: 3,290

4. Pállinger Éva, Horváth Zsuzsanna, Falus András. Csontvelői hemopoietikus sejtek összehasonlító vizsgálata hisztamin 4 receptor (H4R) génkiütött és vad genotípusú egerekben. *Orvosképzés*. 2006;81(2):121-125.

5. Horvath Z, Pallinger E, Horvath G, Jelinek I, Buzas EI, Veszely G, Fűrész J, Falus A. Impaired Hematopoietic Proliferation and IL-3 Signaling in Histamine-Deficient, Histidine Decarboxylase Knockout (HDC-/-) Mice. *Exp Hematol*. Revízió alatt.

Egyéb közlemények listája:

1. Pallinger E, Horvath Z, Csoka M, Kovacs GT, Csaba G. Decreased hormone (histamine, serotonine, triiodothyronine) content of immune cells in children during acute lymphocytic leukemia (ALL). Effect of treatment. *Inflamm Res*. Revízió alatt.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani mindazoknak, akik ennek a doktori dolgozatnak a megtervezéséhez és elkészültéhez hozzájárultak.

Először is családomnak szeretném megköszönni a végtelen kitartásukat, és a rengeteg segítséget, amit a munkám során mindenféle szinten nyújtottak, a folyamatos lelki megerősítésen túl az anyagi támogatásukkal is. Elmondhatatlanul hálás vagyok édesapámnak, ***Dr. Horváth Győzőnek***, aki nemcsak hogy mindig mellettem állt, és tartotta bennem a lelket, hanem aki aktívan részt vett az in vivo kísérletek tervezésében, aki lehetőséget biztosított a besugarazásokra az Országos Sugáregészségügyi és Sugárhigiénés Kutató Intézetben, aki rendkívül nagy gyakorlati tapasztalattal segített az állatok szakszerű feldolgozásában, és akitől ezáltal rengeteg metodikai fogást és egyfajta alapvető szakmai gondolkodásmódot tanultam. Ki kell emelnem bátyámnak, ***Horváth Győzőnek*** a segítségét, aki készségesen megtanított különböző számítógépes programok használatára, és ezáltal minőségi grafikai megoldásokkal gazdagíthattam a dolgozatomat, valamint az Európai Hisztaminkutató Társaság (EHRS) hivatalos honlapszerkesztőjeként is megállhattam a helyem. És végül szeretném megköszönni páromnak, ***Németh Zoltánnak***, hogy mindvégig itt volt mellettem, szeretetével és türelmével megkönnyítette számomra ezeket az éveket.

Másodszor, köszönetet szeretnék mondani „főnökeimnek", akik nélkül ez a dolgozat sosem készülhetett volna el. Hálás vagyok témavezetőimnek, ***Buzás Editnek*** és ***Pállinger Évának***, hogy irányításukkal és támogatásukkal mindvégig mellettem álltak, rengeteg elméleti és szakmai segítséget nyújtottak akkor is, amikor már nem dolgoztam főállásban az intézetnél. Köszönöm nekik, hogy a munkatársi kapcsolaton túl megtiszteltek baráti bizalmukkal is, ezáltal életreszóló kapcsolat alakulhatott ki közöttünk. Ezen kívül Éva volt az, aki bevezetett a flow citometria rejtelmeibe, segített a kísérletek kidolgozásában, a mérésekben és a kiértékelésben. Köszönöm továbbá programvezetőmnek, ***Falus Andrásnak,*** hogy megteremtette a tudományos munkámhoz szükséges feltételeteket, és megadta azt az irányítást és támogatást, amire szükségem volt. Köszönöm a türelmét, és hogy sosem vesztette el a bizalmát bennem, még akkor sem, amikor én magam kételkedtem a képességeimben.

Szeretném megköszönni ***Veszely Gizellának*** és ***Fűrész Józsefnek,*** a Magyar Honvédség Egészségvédelmi Intézetének munkatársának és vezetőjének, hogy gyakorlati segítséget és lehetőséget biztosítottak a CFU assay-k kivitelezéséhez.

Köszönet illeti mindazokat, akikkel az SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézete, valamint az MTA-Semmelweis Egyetem Immungenomikai Kutatócsoportja munkatársaként egy laborban dolgozhattam ez alatt az idő alatt, és akik befogadtak összeszokott társaságukba, akiktől számtalan metodikát tanulhattam, és akik tudásukkal, tanácsaikkal, ötleteikkel sokat tettek a tudományos munkámhoz, amiért örökre hálás vagyok nekik. Köszönöm ***Kozák Angélának*** az értékes gyakorlati tanácsokért a flow citometriás méréseknél, ***Hegyesi Hargitának*** az mRNS és PCR technikák megtanításáért, ***Tóth Sárának*** és ***Nagy Krisztinának*** az in vitro kísérletekhez nyújtott segítségükért, végül szobatársamnak, ***Fülöp András Kristófnak***, aki mindig türelmesen meghallgatott, és akitől szintén értékes tanácsokat kaptam.

Végezetül ki kell emelnem az intézet fiatal kutatóit, akik egyrészt remek hangulatot teremtettek a laborban és azon kívül is, másrészt észrevételeikkel és ötleteikkel rendkívül sokat lendítettek a munkámon. Köszönöm ***Pós Zoltánnak*** és ***Molnár Viktornak,*** hogy bevezettek a statisztikai elemzések rejtelmeibe. Végezetül pedig külön meg kell említenem ***Jelinek Ivettet***, aki szakmai tanácsokon és új metodikák megtanításán kívül a kitartásával és a tudomány iránti odaadásával felbecsülhetetlen mértékben segített, és mindig új lendületet adott a saját munkámhoz. Ő volt az, aki mindvégig bízott bennem, akivel számtalan nagyszerű élménnyel lettünk gazdagabbak, és akinek a személyében ezalatt a pár év alatt az egyik legértékesebb barátra leltem.