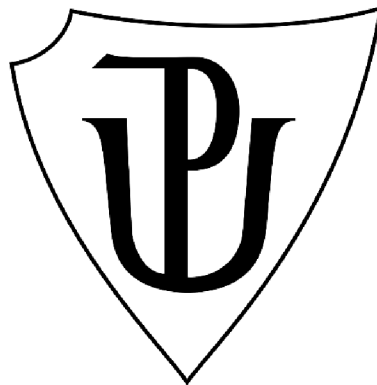


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Imunomodulační vlastnosti mezenchymálních
kmenových buněk**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lenka Bachanová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Weissová
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce bakalářské práce Mgr. Evě Weissové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracovávání bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Andree Exnerové a Mgr. Marii Krátké za cenné rady, trpělivost a ochotu pomoci při práci v laboratoři a při vyhodnocování výsledků.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Dr. Kristině Nešporové a celému oddělení Fyziologie buňky za vstřícný přístup během mého pobytu ve firmě Contipro.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lenka Bachanová
Název práce	Imunomodulační vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Fyziologie buňky, Contipro a.s.
Vedoucí práce	Mgr. Eva Weissová
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

V posledních dvou desetiletích jsou mezenchymální kmenové buňky velmi intenzivně studovány pro svoje jedinečné vlastnosti související s regulací imunitní odpovědi a podpory procesu regenerace poškozené tkáně. Prostřednictvím výsledků ze základního výzkumu bylo zjištěno, že mezenchymální kmenové buňky vykazují parakrinní a imunosupresivní aktivitu a že zprostředkovávají svými povrchovými receptory kontakt s buňkami vrozené i získané imunity, díky čemuž se mohou aktivně zapojovat do imunitních reakcí. Díky těmto imunomodulačním vlastnostem a migraci mezenchymálních kmenových buněk do místa zánětu či poškozené tkáně se stávají tyto buňky velice nadějným nástrojem v léčbě mnoha onemocnění. Imunomodulační vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk byly v rámci této bakalářské práce ověřeny *in vitro* stanovením hladiny prozánětlivého cytokinu interleukinu 6.

Klíčová slova	mezenchymální kmenové buňky, imunomodulační vlastnosti, interleukin 6, zánět, autoimunitní onemocnění
Počet stránek	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lenka Bachanová
Title	Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells
Type of thesis	Bachelor
Department	Cell physiology, Contipro a.s.
Supervisor	Mgr. Eva Weissová
The year of presentation	2022

Abstract

In the last two decades, mesenchymal stem cells have been extensively studied for their unique properties related to the regulation of the immune response and supporting the process of regenerating damaged tissue. Through the results of basic research, it was found that mesenchymal stem cells show paracrine and immunosuppressive activity and that their surface receptors mediate contact with cells of innate and acquired immunity, which allows them to be actively involved in immune responses. Due to these immunomodulatory properties and the migration of mesenchymal stem cells to the site of inflammation or damaged tissue, these cells are becoming a very promising tool in the treatment of many diseases. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells were verified in vitro in this bachelor thesis by determining the level of the proinflammatory cytokine interleukin 6.

Keywords	mesenchymal stem cells, immunomodulatory properties, interleukin 6, inflammation, autoimmune diseases
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Mezenchymální kmenové buňky	2
2.1.1	Charakteristické znaky.....	2
2.1.2	Migrace	4
2.1.3	Imunomodulační vlastnosti	4
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	15
3.1	Materiál.....	15
3.1.1	Buněčné linie	15
3.1.2	Biologický materiál.....	15
3.1.3	Chemikálie	15
3.1.4	Roztoky	16
3.1.5	Pomůcky	16
3.1.6	Přístrojové vybavení	17
3.1.7	Použitý software.....	17
3.2	Metody	17
3.2.1	Izolace MSCs	17
3.2.2	Kultivace MSCs	18
3.2.3	Stanovení počtu a viability buněk	19
3.2.4	Průtoková cytometrie	20
3.2.5	Kokultivace MSCs s THP-1 buněčnou linií.....	21
3.2.6	Sendvičová ELISA.....	23
4	VÝSLEDKY	25
4.1	Identifikace psích MSCs povrchovými markery.....	25
4.2	Stanovení hladiny prozánětlivého cytokinu IL-6.....	26
5	DISKUSE.....	29
6	ZÁVĚR	31
7	LITERATURA	32
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	42

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

1. Vypracování přehledné literární rešerše zaměřené na imunomodulační vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk, jejich mechanismus působení a využití v klinické praxi.

Experimentální část

1. Izolace a kultivace mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně a tukové tkáně.
2. Stanovení charakteristických povrchových markerů mezenchymálních kmenových buněk pomocí průtokové cytometrie.
3. Ověření imunomodulačních vlastností mezenchymálních kmenových buněk *in vitro*.

1 ÚVOD

Mezenchymální kmenové buňky jsou multipotentní nehematopoetické kmenové buňky, které během embryonálního vývoje vznikly ze středního zárodečného listu, mezodermy. Díky schopnosti sebeobnovy a diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk na terminální buňky mezodermální linie se specializovanou funkcí se staly tyto kmenové buňky středem pozornosti v buněčné terapii a regenerativní medicíně (Kassem et al., 2004). Pro použití v terapii jsou mezenchymální kmenové buňky izolovány z dospělých tkání mezodermálního původu a následně kultivovány pro získání potřebného terapeutického množství. Díky imunitní privilegovatelnosti mezenchymálních kmenových buněk mohou být injektovány do těla pacienta bez větších obav vzniku imunitní reakce vedoucí k odvržení těchto buněk (Le Blank et al., 2002).

Mechanismus účinku terapie mezenchymálními kmenovými buňkami nebyl dosud zcela objasněn. Pro pochopení terapeutického účinku mezenchymálních kmenových buněk se současné studie zaměřují především na výzkum imunomodulačních vlastností těchto buněk (Dias et al., 2019; Shi et al., 2021). Mezenchymální kmenové buňky vykazují schopnost modulovat imunitní reakce pomocí přímé interakce mezi imunitními buňkami, imunosupresivní a parakrinní aktivity, která spočívá v produkci mnoha desítek bioaktivních látek, především cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. Prostřednictvím parakrinní interakce se širokou škálou buněk vrozené i získané imunity se mohou mezenchymální kmenové buňky aktivně zapojovat do imunitní odpovědi organismu (Gao et al., 2016). Mezenchymální kmenové buňky se skrze imunomodulační a regenerační vlastnosti ve spojení s vysokou schopností proliferace *in vitro* staly velice nadějným nástrojem v léčbě mnoha onemocnění a defektů (Makhlough et al., 2018; Wu et al., 2019).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Mezenchymální kmenové buňky

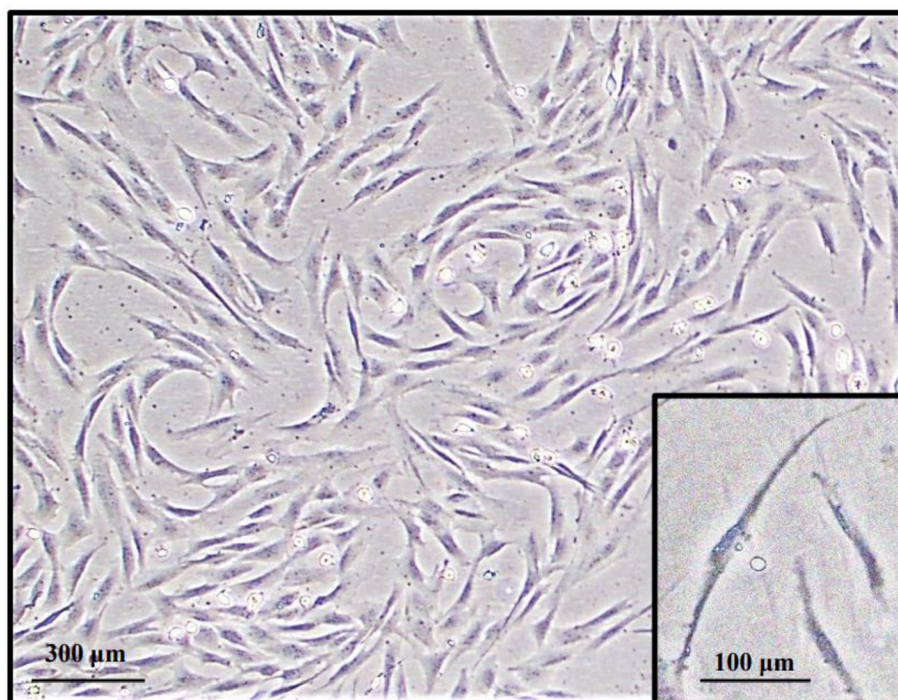
2.1.1 Charakteristické znaky

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSCs) jsou klasifikovány jako multipotentní nehematopoetické stromální kmenové buňky, které se vyznačují schopností sebeobnovy a diferenciací na terminální buňky mezodermální linie. Morfologicky vykazují MSCs podobnost vůči fibroblastům, které mají protáhlý vřetenovitý tvar s mnoha nepravidelnými výběžky, viz obr. 1 (Kassem et al., 2004).

MSCs byly objeveny v roce 1968 Friedensteinovým výzkumným týmem v kostní dřeni. Jelikož od objevení MSCs začaly při izolacích těchto buněk vznikat pochybnosti ohledně jednoznačné identifikaci kmenové populace izolovaných buněk, stanovila Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (The International Society for Cellular Therapy, ISCT) v roce 2006 tři kritéria kmenovosti pro určení lidských MSCs (Dominici et al., 2006):

1. MSCs musí být schopny přilnout k plastovému povrchu kultivační lahve za standardních kultivačních podmínek specifických pro tyto kmenové buňky.
2. MSCs musí na svém povrchu nést markery CD105, CD73 a CD90, zároveň nesmějí nést markery typické pro hematopoetické buňky, což jsou markery CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 a HLA-DR.
3. MSCs musí mít schopnost diferenciací na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty *in vitro*.

Výše popsané CD markery ISCT charakterizují pouze lidské MSCs, zastoupení CD markerů u dalších živočišných druhů zmapoval Calloniho tým ve své studii z roku 2014. Například psi MSCs jsou pozitivní pro markery CD29, CD44 a CD90 a negativní pro markery CD34, CD45 a CD105 (Calloni et al., 2014).



Obr. 1: Mikroskopický snímek nediferencovaných psích MSCs. Zvětšení 40×. Vpravo dole je zobrazen detailní snímek protáhlého větvenovitého tvaru MSCs. Zvětšení 100×.

MSCs nacházející se v savčím organismu existují v jedinečném mikroprostředí, v tzv. nise, která má na starost udržení ideálních viabilních podmínek a také zajišťuje ochranu těchto buněk před nadměrnou proliferací, apoptotickými a diferenciačními signály. Nepřítomnost prostředí niky, ať už z důvodu jejího poškození nebo úplného zániku, podněcuje MSCs k diferenciaci na buňky tkáně, ve které se právě nacházejí (Slack, 2018).

MSCs se v organismu vyskytují v dospělých tkáních mezodermálního původu, ze kterých mohou být izolovány, například v kostní dřeni, tukové tkáni, placentě, pupečníku, synoviální membráně a dále například v zubní dřeni (Pittenger et al., 1999; Aust et al., 2004; in't Anker et al., 2004; Seo et al., 2004; Fan et al., 2009). Některé studie se domnívají, že je hojný výskyt MSCs v dospělých tkáních mezodermu uskutečněn pomocí pericytů, což jsou kontraktilní buňky mezodermálního původu s četnými výběžky nacházející se podél vnějších stěn kapilár. Předpokládá se, že jelikož jsou tkáně v těle obklopeny sítí kapilár, je prostřednictvím této kapilární sítě zajištěna transmigrace MSCs z krve do tkání a z tkání do krve (Cheng et al., 2013; da Silva Meirelles et al., 2016; Guimarães-Camboa et al., 2017).

2.1.2 Migrace

MSCs vykazují schopnost migrace z mikroprostředí niky přes cévní síť do místa zánětu nebo poškozené tkáně, kde se následně aktivně zapojují do imunomodulačních, opravných a regeneračních procesů (Li et al., 2011). V současné době není mechanismus cílené migrace MSCs zcela objasněn. Předpokládá se, že na cílené migraci MSCs se podílí řada chemokinových receptorů a receptorů růstových faktorů (Neuss et al., 2004; Sordi et al., 2005; Forte et al., 2006; Ringe et al., 2007). Jako další možný „naváděcí signál“ migrace MSCs se jeví závislost různých párů sekretovaného cytokinu a buněčného receptoru (Schmidt et al., 2005; Son et al., 2006). Kromě chemických faktorů se na cílené migraci MSCs podílí i faktory mechanické. Během migrace MSCs cévním řečištěm postupně dochází k těsnému přilnutí MSCs ke stěnám cév, kde jsou následně tyto buňky ovlivňovány hemodynamickými faktory. Mezi nejdůležitější hemodynamické faktory působící na přilnuté MSCs se řadí mechanické namáhání a smykové napětí (Yuan et al., 2012; Zhang et al., 2015).

2.1.3 Imunomodulační vlastnosti

MSCs jsou díky své rozmanitosti biologických vlastností ve vysoké míře využívány v buněčné terapii a regenerativní medicíně pro léčbu mnoha onemocnění a řady defektů. Izolované a kultivované MSCs (alogenní či autologní) mohou být při terapeutickém použití injektovány buď intravenózně, nebo přímo do místa poškození či zánětu. Bylo zjištěno, že MSCs se po transplantaci do organismu jeví jako imunitně privilegované. Tato vlastnost MSCs je daná přítomností střední exprese molekul hlavního histokompatibilního komplexu I (MHC) a nízké, nebo žádné, exprese molekul MHC II a Fas ligandu. Uvedené vlastnosti zprostředkovávají MSCs možnost uniknout rozpoznání imunitním systémem, který by mohl iniciovat odstranění transplantovaných MSCs z organismu (Le Blank et al., 2002).

Imunomodulační schopnost MSCs spočívá v ovlivnění imunitních reakcí vedoucích jednak k imunostimulaci, a jednak k imunosupresi. Přesný mechanismus účinku imunomodulace MSCs stále není známý a v současné době je středem pozornosti mnoha studií, které se zaměřují především na výzkum interakcí MSCs s buňkami cílové tkáně a na modulaci zánětu interakcí MSCs s buňkami imunitního systému (Marzban et al., 2018; Wu et al., 2019; Shi et al., 2021). Dříve bylo předpokládáno, že se MSCs v místě poškození diferencují na buňky poškozené tkáně, nové studie však ukazují, že MSCs vykazují spíše imunomodulační efekt pomocí imunosupresivní a parakrinní

aktivity, která spočívá v produkci celé škály bioaktivních látek, zejména cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (Dias et al., 2019; Cao et al., 2020; Rodríguez-Fuentes et al., 2021). Dalším parakrinním mechanismem, kterým mohou MSCs interagovat s poškozenými nebo imunitními buňkami, je skrze extracelulární vezikuly (EV), zejména exosomy. Exosomy odvozené od MSCs zprostředkovávají prostřednictvím transportu proteinů, lipidů, nukleových kyselin, mRNA a regulační mikroRNA intracelulární signalizaci a mezibuněčnou komunikaci (György et al., 2015). Nutno ale podotknout, že byl zjištěn odlišný terapeutický potenciál exosomů odvozených od MSCs izolovaných z různých tkání mezodermu. V tomto směru bylo například ve studii Katsuda et al. (2013) zaměřené na léčbu Alzheimerovy nemoci pomocí exosomů odvozených od MSCs izolovaných z lidské tukové tkáně poukázáno, že injektované exosomy odvozené od MSCs z lidské tukové tkáně vykazují ve srovnání s exosomy odvozenými od MSCs z kostní dřeně až čtyřnásobně vyšší koncentraci enzymu neprilysinu degradujícího β -amyloidní peptidy v mozku.

MSCs vykazují také schopnost zprostředkovat svými povrchovými receptory přímý kontakt s buňkami vrozené i získané imunity, čímž se aktivně mohou zapojovat do modulace komplexních imunitních procesů a reakcí dysfunkčního imunitního systému (Cahill et al., 2015; Wang et al., 2018). Ačkoliv mají MSCs schopnost interagovat s buňkami imunitního systému, nejsou považovány za jeho součást (Li et al., 2017).

2.1.3.1 Interakce MSCs s buňkami vrozené imunity

2.1.3.1.1 Dendritické buňky

Dendritické buňky (dendritic cells, DC) jsou podskupinou bílých krvinek vyznačující se schopností fagocytovat patogenní buňky a stimulovat aktivitu makrofágů. DC mohou navodit zánětlivou reakci aktivací T-lymfocytů uskutečněnou pomocí přímého mezibuněčného kontaktu a produkce cytokinů. Nedávné studie ukázaly, že MSCs mají schopnost inhibovat diferenciaci, zrání a aktivaci DC prostřednictvím snížení exprese MHC II, CD1- α , CD40, CD80, CD83 a CD86 (Shahir et al., 2020). Podle některých studií by mohly MSCs zprostředkovat indukci DC do protizánětlivého fenotypu prostřednictvím snížení prozánětlivých faktorů, např. interleukinu 6 (IL-6) nebo faktoru nádorové nekrózy α (TNF- α), a zvýšení protizánětlivých faktorů, např. IL-10, prostaglandinu E2 (PGE2) a faktoru stimulující kolonie makrofágů (Jiang et al., 2020).

2.1.3.1.2 Makrofágy

Makrofágy představují heterogenní populaci myeloidních buněk nespecifické imunity schopné fagocytózy, které vznikají tkáňovou přeměnou monocytů (Genin et al., 2015). Ve tkáních po přeměně monocytů na makrofágy následně dochází prostřednictvím cytokinů k polarizaci makrofágů. Podle možnosti polarizace se rozdělují makrofágy na dva základní typy, které se vyznačují rozdílnou expresí povrchových receptorů a produkcí signálních molekul, jako jsou např. cytokiny a chemokiny. Podle zjednodušené klasifikace vznikají klasicky aktivované makrofágy typu M1 (tzv. prozánětlivé) v přítomnosti zánětlivých molekul, jako je například lipopolysacharid nebo cytokiny pomocných T-lymfocytů typu 1 (Th1), jako je např. interferon gama (IFN- γ). M1 makrofágy se podílejí na vzniku zánětu produkcí prozánětlivých cytokinů (např. IL-6, IL-12 nebo TNF- α), cytotoxických látek (např. oxid dusnatý) a chemokinů (např. CXCL10) (Selleri et al., 2016; Funes et al., 2018). Naproti tomu alternativně aktivované makrofágy typu M2 (tzv. protizánětlivé) jsou polarizovány protizánětlivými cytokiny, jako je například IL-4 (Munder et al., 1999). M2 makrofágy se vyznačují tím, že produkují nízké hladiny prozánětlivých cytokinů a naproti tomu vysoké hladiny imunosupresivních cytokinů, jako je např. IL-10 nebo transformující růstový faktor β , TGF- β (Gordon et al., 2010). Funkcí makrofágů typu 2 je indukovat proces hojení a regenerace poškozených tkání skrze sekreci vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), epidermálního růstového faktoru (EGF) a destičkového růstového faktoru (PDGF) (Wynn et al., 2016).

Jakým mechanismem mohou MSCs ovlivňovat fenotypovou transformaci makrofágů není přesně známo. Několik studií poukazuje na ovlivnění polarizace makrofágů MSCs prostřednictvím přímého mezibuněčného kontaktu a sekretovaných cytokinů. IL-10 sekretovaný MSCs je považován za jeden z hlavních zprostředkovatelů transformace makrofágů na fenotyp M2. Mezi další sekretované bioaktivní látky podporující M2 fenotypové transformaci patří například indoleamin 2,3-dioxygenasa (IDO), PGE2 a TGF- β (Park et al., 2018; Liu et al., 2019).

2.1.3.1.3 NK buňky

NK buňky se řadí do podskupiny bílých krvinek, které detekují virové a bakteriální buňky. NK buňky jsou schopny interagovat s MSCs pomocí přímého mezibuněčného kontaktu, sekretovaných cytokinů nebo exosomů (Moloudizargari et al., 2021). MSCs mají schopnost navodit imunosupresi inhibicí proliferace a aktivace NK buněk prostřednictvím PGE2,IDO a TGF- β (Spaggiari et al., 2008). Chatterjee et al. si všimli ve své studii z roku 2014 zvýšené exprese CD73 na povrchu NK buněk při kokultivaci s MSCs, zatímco v periferní krvi se u NK buněk vyskytuje pouze 1% zastoupení markeru CD73. Prostřednictvím zvýšené exprese CD73 u NK buněk docházelo v této studii k parakrinní a autokrinní regulaci neovlivněných NK buněk skrze přeměnu adenosinmonofosfátu na adenosin, který dokáže zprostředkovat inhibici zánětlivé reakce.

2.1.3.2 Interakce MSCs s buňkami získané imunity

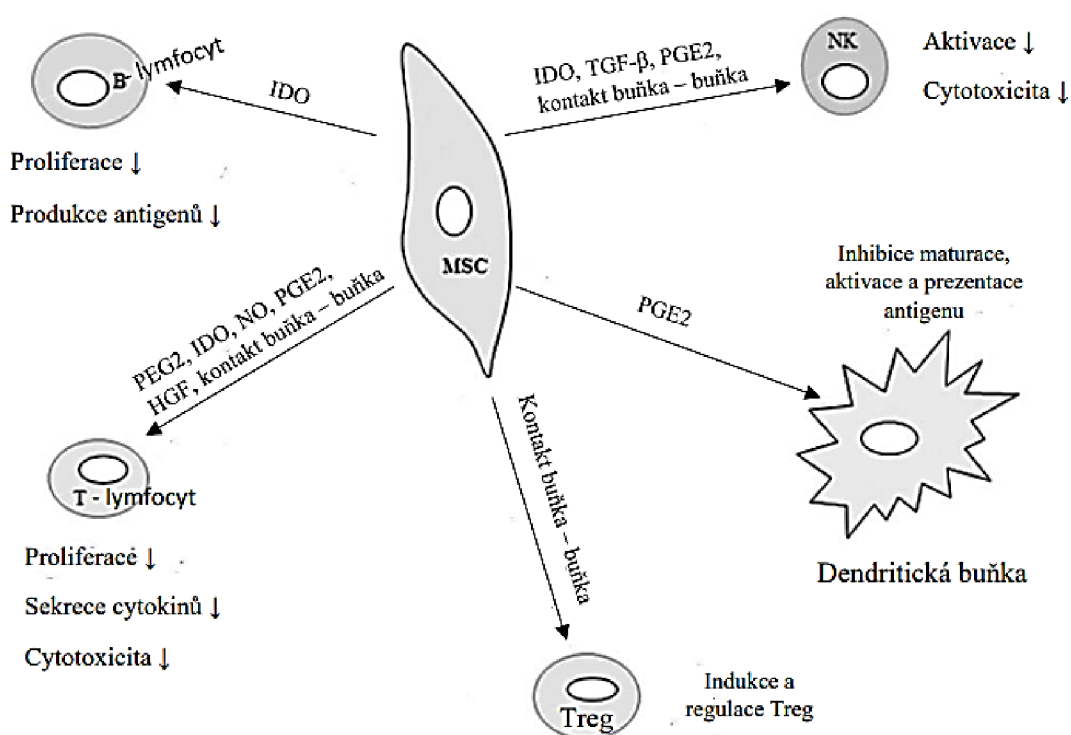
2.1.3.2.1 T-lymfocyty

T-lymfocyty jsou druhem bílých krvinek, které vznikají v kostní dřeni a dozrávají v brzlíku. Bylo zjištěno, že cytokiny vylučované MSCs mohou mít vliv na inhibici T-lymfocytů a indukci regulačních T-lymfocytů (Treg), které inhibují imunitní odpověď a zmírňují zánětlivou reakci (Luz-Crawford et al., 2013). Bylo zjištěno, že MSCs sekretují ve vysoké míře TGF- β , který je považován za hlavní imunosupresivní cytokin ovlivňující produkci Treg (Svobodová et al., 2012). PGE2 vylučovaný MSCs dokáže snížit proliferaci T-lymfocytů a navodit jejich diferenciaci do Treg. Kromě PGE2 hraje důležitou roli v imunosupresi zprostředkované MSCs také IDO a hepatocytární růstový faktor, HGF (Meisel et al., 2004; Aggarwal et al., 2005). Aktivované T-lymfocyty mohou produkovat IFN γ , který navázáním na inhibiční povrchovou molekulu MSCs vyvolá imunosupresivní reakci (Sheng et al., 2008). Sato et al. ve své studii z roku 2016 poukazují na kritickou roli oxidu dusnatého vylučovaného MSCs při potlačení proliferace T-lymfocytů prostřednictvím inhibice převodníku signálu a aktivátoru transkripce 5 (Stat5).

2.1.3.2.2 B-lymfocyty

B-lymfocyty jsou podskupinou bílých krvinek vznikající a zároveň dozrávající v kostní dřeni. Přispívají k aktivaci imunitní odpovědi skrze produkci protilátek a cytokinů. MSCs při přímém mezibuněčném kontaktu s B-lymfocyty regulují sekreci imunoglobulinů, apoptózu, proliferaci a chemotaxi B-lymfocytů a diferenciaci plazmatických buněk (Fan et al., 2016). MSCs mají schopnost imunosuprese regulací proliferace a diferenciaci B-lymfocytů, na druhé straně inhibují apoptózu B-lymfocytů a indukují produkci regulačních B-lymfocytů (Bregs). Bregs jsou považovány za hlavní zprostředkovatele imunosuprese u zánětlivých onemocnění a u dysfunkcí imunitního systému hlavně prostřednictvím sekrece IL-10, ale také IDO a TGF- β , které se vyznačují protizánětlivými účinky (Mauri et al., 2015; Nouël et al., 2015).

Imunomodulační efekt MSCs na výše popsané buňky imunitního systému je schematicky znázorněn na obr. 2.



Obr. 2: Imunomodulační efekt MSCs na buňky imunitního systému. Imunomodulační efekt MSCs zahrnuje potlačení proliferace B-lymfocytů a T-lymfocytů, indukci a regulaci Treg, inhibici NK buněk a inhibici maturace dendritických buněk a jejich aktivaci. Imunomodulační efekt MSCs je zprostředkován sekretovanými bioaktivními látkami a kontaktem buňka – buňka. Převzato a upraveno podle Gao et al., 2016.

2.1.3.3 Využití imunomodulačních vlastností MSCs v klinické praxi

Zánětlivá reakce je fyziologicky ochranný mechanismus vrozené imunity iniciující imunitní systém ke komplexní obranné reakci organismu proti vnějším i vnitřním faktorům (Loza et al., 2007). Zánětlivá odpověď organismu je rozdělována na akutní a chronickou. Po akutní zánětlivé odpovědi nedochází v ideálním případě k žádným trvalým následkům a poškozená tkáň je kompletně zhojena. Chronická zánětlivá odpověď je patologickou reakcí organismu, při níž často dochází k trvalému poškození tkáně, která je nedokonale nahrazována nefunkční vazivovou tkání. Za buňky řídící vznik zánětu jsou považovány makrofágy, které vylučují prozánětlivé cytokiny spolu s dalšími bioaktivními látkami mající na starost vyvolání zmnožení lymfocytů a stimulaci produkce složek humorální imunity (Hořejší et al., 2013). MSCs vykazují schopnost modulace nadměrné zánětlivé a autoimunitní reakce snížením hladin zánětlivých faktorů, inhibicí proliferace buněk imunitního systému a navrácením hladin imunoglobulinů do fyziologických mezí (Wang et al., 2019). Imunomodulační vlastnosti MSCs ve spojení s proregenerativními, antimikrobiálními a antiapoptotickými vlastnostmi vykazují obrovský potenciál pro využití těchto buněk v humánní i veterinární medicíně (Akiyama et al., 2012; Parys et al., 2016; Lacitignola et al., 2017). Díky výše zmíněným vlastnostem MSCs ve spojení s vysokou schopností proliferace *in vitro* se staly tyto kmenové buňky středem pozornosti v léčbě mnoha onemocnění, jako je například Crohnova nemoc, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, Sjögrenův syndrom, systémový lupus erythematosus, nemoc křehkých kostí, dále při poškození buněk plic, ledvin, jater nebo míchy (Bang et al., 2005; Liang et al., 2010; Wang et al., 2014; Mendonça et al., 2014; Molendijk et al., 2015; Suk et al., 2016; Liang et al., 2018; Makhloogh et al., 2018; Liu et al., 2020; Shi et al., 2021).

Jelikož poskytuje buněčná terapie a regenerativní medicína založená na transplantaci MSCs tak široké uplatnění, bylo vybráno jedno terapeutické využití těchto buněk z řady transplantačních komplikací (reakce štěpu proti hostiteli), obnovy buněk mezodermální linie (osteoartritida), buněk endodermální linie (diabetes mellitus 1. typu) a obnovy buněk ektodermální linie (roztřoušená skleróza).

2.1.3.3.1 Reakce štěpu proti hostiteli

Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease, GvHD) je zdravotní komplikace, která vzniká po přijetí geneticky odlišného (alogenního) transplantátu tkáně. Imunitní systém příjemce vyhodnotí buňky od dárce jako cizí a způsobí jejich destrukci (Hořejší et al., 2013). GvHD se nejčastěji vyznačuje kožními projevy, ale klinické projevy jsou značně variabilní a někdy mohou vést až k úmrtí pacienta (Lee et al., 2003). Současná terapeutická léčba GvHD spočívá pouze v podávání kortikosteroidů. Při podávání těchto látek, mnohdy ve vysokých dávkách, ve většině případů dochází k vzniku dalších nežádoucích komplikací a v delším časovém horizontu může vzniknout u pacienta až absolutní rezistence na tuto léčbu (MacMillan et al., 2002).

MSCs představují slibnou možnost léčby GvHD, jelikož MSCs postrádají expresi antigenů MHC II, jako jsou HLA-DR, CD14, CD80 a CD89, čímž brání aktivaci imunitního systému a následnému odvržení tkáně. Ve studii Casiraghi et al. (2008) poukazují na myším modelu s transplantovaným srdcem, že po podání MSCs do portální a ocasní žíly došlo k indukci Tregs, prostřednictvím kterých byla zaznamenána inhibice imunitní reakce na transplantovaný orgán. Na vhodnost léčby akutní GvHD u myši poukazuje studie Fujii et al. (2018), ve které byly podány EV odvozené od MSCs izolovaných z kostní dřeně, které redukovaly klinické projevy akutní GvHD pomocí indukce Tregs uskutečněné pravděpodobně skrze transport mikroRNA. Na vhodnost léčby MSCs z kostní dřeně na chronický průběh GvHD u lidí poukazuje studie Boberg et al. (2020), která zahrnovala 11 pacientů s GvHD (6 žen a 5 mužů) ve věkovém rozmezí 21-61 let, z nichž 2 v průběhu klinické studie zemřeli kvůli chronickému průběhu GvHD, u zbylých 6 pacientů bylo dosaženo po podání MSCs celkového zlepšení stavu hodnoceného podle přísných kritérií Národního institutu zdraví. V současné době není mechanismus léčby GvHD pomocí MSCs zcela objasněn a je potřeba rozsáhlejších klinických studií.

2.1.3.3.2 Osteoartritida

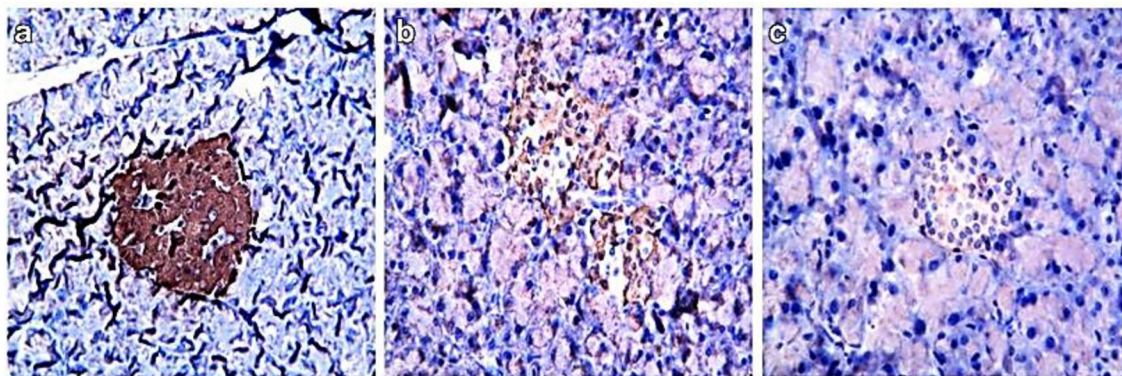
Osteoartritida je zánětlivé a degenerativní onemocnění kloubů. Typickým projevem osteoartrity je destrukce hyalinní kloubní chrupavky a poškození epifyzy projevující se špičatými kostními výrůstky tzv. osteofyty. Nastane-li případ, že kloubní chrupavka není schopna plnit svou ochrannou funkci, dochází ke tření epifyz, které se projevuje silnou bolestí a oslabením kloubních vazů (Musumeci et al., 2015). Současná léčba osteoartrity je založena pouze na symptomatické léčbě (Zou et al., 2016).

Jako alternativní možnost léčby osteoartrity se jeví podávání exosomů odvozených od MSCs vzhledem k pozitivním výsledkům klinických studií. Buněčná terapie založená na intraartikulárním podávání MSCs vykazuje schopnost snížit lokální zánět a iniciovat obnovu chondrocytů například prostřednictvím TGF- β vylučovanému MSCs (Velasco et al., 2011). Ve studii Zhang et al. (2020) bylo prokázáno, že exosomy odvozené od MSCs pomohly zmírnit projevy osteoartrity u testovaných krys prostřednictvím polarizace makrofágů z M1 na M2 *in vitro*. Wu et al. (2019) ukázali na testovaných vzorcích chrupavčitých tkání od pacientů, kteří prodělali totální endoprotézu kolenního kloubu, že MSCs odvozené z infrapatelárního tukového polštáře v kombinaci chitosanu s kyselinou hyaluronovou pomáhají snížit degradační proces v kloubní chrupavce a napomáhají obnově chondrocytů.

2.1.3.3.3 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu (DM1T) je autoimunitní zánětlivé onemocnění zprostředkované T-lymfocyty, které způsobují destrukci β -buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní produkujících inzulín. Léčba DM1T je prováděna skrze podávání inzulínu (subkutánně nebo intravenózně), regulací stravy a fyzické aktivity. Inzulínová terapie ale skrývá své nedostatky v metabolické kontrole inzulínu. Při podání exogenního inzulínu byly zaznamenány závažné hypoglykemické stavy pacientů, neboť exogenně podávaný inzulín nedokáže přesně napodobit fyziologickou sekreci inzulínu v těle (Pomahačová a Kalvachová, 2013). U možnosti transplantace slinivky břišní nebo samotných β -buněk Langerhansových ostrůvků nastává komplikace s nedostatkem dárců orgánů a možnými přidruženými komplikacemi (např. imunitní rejekce), které se pojí s transplantacemi (Adler et al., 2019). Z těchto důvodů jsou naléhavě hledány nové možnosti léčby DM1T, které by nezpůsobovaly náhlé vychýlení hladiny inzulínu v krvi.

Jako nové řešení léčby DM1T se jeví buněčná terapie založená na podávání MSCs. Studie Mesples at al. (2013) zaměřená na imunoterapii s použitím autologních MSCs poukazuje na možný stimulační účinek použitých MSCs na β -buňky Langherharsových ostrůvků u pacientů s nedávno diagnostikovaným DM1T. V této studii byla stanovována bezpečnost a účinnost autologní transplantace MSCs izolovaných z kostní dřeně u dvou pacientů s diagnostikovaným DM1T. Bylo ukázáno, že MSCs injektované jaterní punkcí pomohly snížit hladiny protilátek Langherharsových ostrůvků, dekarboxylasy kyseliny glutamové a inzulinových protilátek u testovaných pacientů s DM1T během 12 měsíců. Ve studii Katuchova et al. (2015) bylo potvrzeno, že po injekčním podání MSCs do tkáně pankreatu u diabetických potkanů došlo ke zlepšení příznaků DM1T díky snížení hladiny glukosy v krvi. Imunohistochemický profil pankreatické tkáně u diabeticky léčených krys pomocí MSCs je zobrazen na obr. 3.

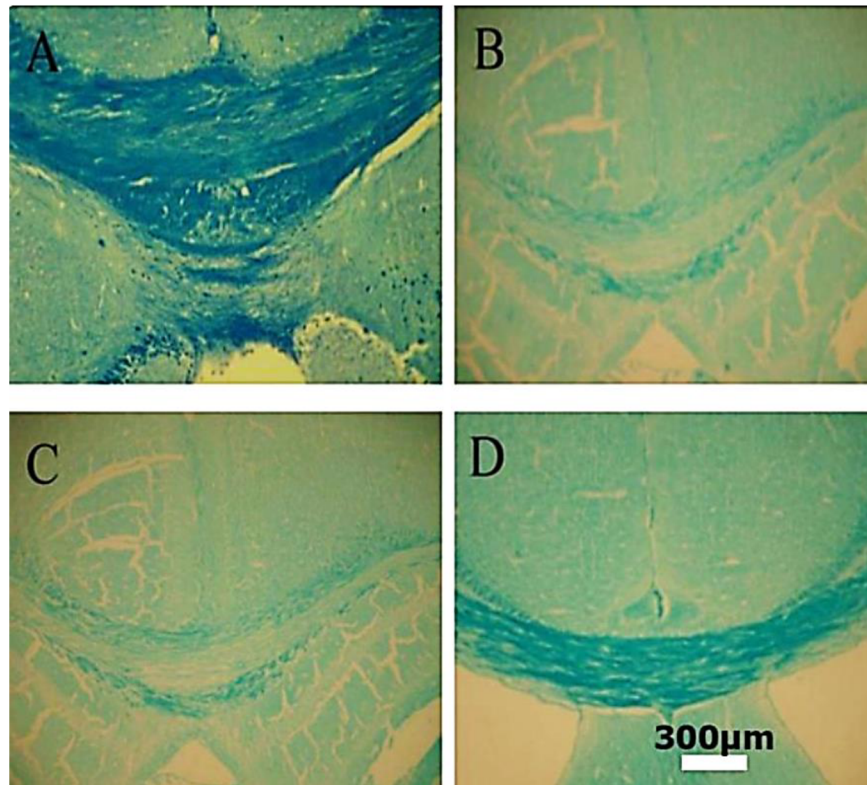


Obr. 3: Imunohistochemický snímek potkaního pankreatu s anti-inzulinovou monoklonální protilátkou od – **a)** normálních kontrolních potkanů, **b)** diabetických potkanů léčených MSCs injektovaných do celého pankreatu a **c)** diabetických kontrolních potkanů bez léčby MSCs. Převzato od Katuchova et al., 2015.

2.1.3.3.4 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) se řadí mezi chronické autoimunitní zánětlivé a neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému (CNS). Příčinou RS je demyelinizace a ztráta neuronů zprostředkovaná T-lymfocyty. RS se projevuje motorickým a smyslovým postižením (Dutta et al., 2007). V současné době jsou podávány pro léčbu RS imunopresiva, která snižují zánětlivé reakce, nicméně namají schopnost indukovat regeneraci axonů a napomocť remyelinizaci obalů nervových vláken (Sung et al., 2017). Z tohoto důvodu jsou hledány nové terapeutické přístupy k léčbě RS, kde se jako slibná léčba jeví terapie pomocí transplantace MSCs.

Wang et al. (2014) poukázali na schopnost MSCs izolovaných z kostní dřeně podporovat regeneraci oligodendroglíí, které obklopují axony nervových buněk v CNS. Díky nově obnoveným oligodendroglíím došlo k produkci myelinu, a tím i obnovení myelinové pochvy. Marzban et al. (2018) se zabývali studiem účinku MSCs z kostní dřeně na modelu RS u myši s kuprizonem navozeným chronickým poškozením myelinových obalů v mozku. Při intraperitoneálním podání MSCs z kostní dřeně dospělým myším samcům byla pozorována snížená zánětlivá odpověď a také byl zaznamenán pokles demyelinizace v oblasti míchy. U myši, kterým byly intraperitoneálně podány MSCs, bylo pozorováno zmenšení demyelinizované oblasti v *corpus callosum*, viz obr. 4. Nicméně ve studii Marzban et al. (2018) nebyla potvrzena cílená migrace MSCs do *corpus callosum* spojená s procesem remyelinizace této části mozku. Pozitivní výsledky buněčné terapie zprostředkované MSCs byly doloženy i pomocí klinických studií u pacientů s RS, kde bylo prokázáno jednoznačné zlepšení regenerace CNS a snížení přidružených neurologických komplikací vyskytujících se u pacientů s RS po terapeutickém podání MSCs (Lufriu et al., 2014; Petrou et al., 2020).



Obr. 4: Histologické vyšetření myelinu v *corpus collasum*. **A)** normální stav, **B)** kuprizonem indukovaná demyelinizace, **C)** kuprizonem indukovaná demyelinizace s fosfátovým pufrem, **D)** indukovaná remyelinizace MSCs z kostní dřeně. Převzato od Marzban et al., 2018.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Buněčné linie

- MSCs: psí mezenchymální kmenové buňky izolované z biologického materiálu, viz kapitola 3.1.2
- THP-1: lidská monocytární buněčná linie (ACC 16, *Homo sapiens*, DSMZ, Německo)
- NHDF: normální lidské dermální fibroblasty (Normal Human Dermal Fibroblasts) izolované z biologického materiálu, viz kapitola 3.1.2

3.1.2 Biologický materiál

Biologický materiál použitý v bakalářské práci pro získání buněčné linie MSCs představovala tuková tkáň a kostní dřev od psích dárců, které byly získány během rutinně provedených operací na veterinární klinice v Čáslavi.

Buněčná linie NHDF byla dopředu připravena izolací z kůže očních víček, nebo z kůže ušních boltců získaných při kosmetických operacích na klinice v Ústní nad Orlicí.

3.1.3 Chemikálie

- Alpha-MEM (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Forbol 12-myristát 13-acetát (Sigma Aldrich, Česká republika)
- Histopaque (Sigma Aldrich, Česká republika)
- Human IL-6 Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, Rakousko)
- Izotypové kontroly
 - I29: IgG2b kappa krysa, PE (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - I44: IgG2b kappa krysa, FITC (Thermo Fisher Scientific, USA)
 - I45: IgG2a, myš, PA (Abcam, Velká Británie)
 - I90: IgG2b kappa krysa, PE (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kolagenasa (EC 3.4.24.3; Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Biosera, USA)
- Lipopolysacharid z *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma Aldrich, Česká republika)
- Penicilin – Streptomycin (Biosera, BioTech, USA)

- Protilátky
CD29: TS2/16, PE (Thermo Fisher Scientific, USA)
CD44: IM7, FITC (Thermo Fisher Scientific, USA)
CD45: F10-89-4, PA (Bio-Rad, USA)
CD90: YKIX337.217, PE (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Trypsin (EC 3.4.21.4; Biosera, USA)
- Tween -20 (Sigma Aldrich, Česká republika)

3.1.4 Roztoky

3.1.4.1 Fosfátový pufr

Pro přípravu fosfátového pufru (PBS) bylo do litrové nádoby naváženo 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,85 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O a rozpuštěno v 1 l destilované vody.

3.1.4.2 Kultivační médium pro MSCs

Kultivační médium pro MSCs se skládalo z 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 1 % Penicilin – Streptomycin a 89 % Alpha-MEM.

3.1.4.3 Kultivační médium pro THP-1

Kultivační médium pro THP- 1 bylo připraveno z 50 ml FBS, 3,25 ml D – glukosy, 5 ml L – glutaminu, 5 ml pyruvátu sodného, 5 ml Penicilin – Streptomycin a 471,75 ml RPMI média.

3.1.5 Pomůcky

- Buněčné sítko (BioTech, USA)
- Falkony (Schoeller Pharma Praha, Česká republika)
- Kultivační destičky 6jamkové (BioTech, USA)
- Kultivační lahve (BioTech, USA)
- Laboratorní plast (Schoeller Pharma Praha, Česká republika)
- Mikroskopické kádavky (Eppendorf, Německo)
- Nerezové nástroje (Medplus, Česká republika)
- Petriho misky (BioTech, USA)

3.1.6 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (METTLER TOLEDO ME204, Česká republika)
- CASY cell counter (Bioscience, Velká Británie)
- Centrifuga (PrismTM, Labnet international, USA)
- Centrifuga (Trigon Plus BR4i, Česká republika)
- CO₂ inkubátor (N-Biotek, Korejská republika)
- ELISA Multimode plate reader EnSight (PerkinElmer, USA)
- Inkubovaná třepačka (N-Biotek, Korejská republika)
- Inverzní mikroskop (NIKON, Japonsko)
- Laminární box (HerasafeTM, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Orbitální třepačka (IKA Vortex 1, VERKON, Česká republika)
- Pipetboy (BRAND® accu – jet®, Sigma Aldrich, Česká republika)
- Pipety (Eppendorf, VERKON, Česká republika)
- Promývačka (405 LS, BioTek, USA)
- Průtokový cytometr (NovoCyte, ACEA Biosciences, USA)

3.1.7 Použitý software

- Ovládací software pro průtokový cytometr NovoExpress 1.3.0
- Ovládací software pro kvantifikaci IL-6 Kaleido 2.0

3.2 Metody

3.2.1 Izolace MSCs

3.2.1.1 Izolace MSCs z kostní dřene

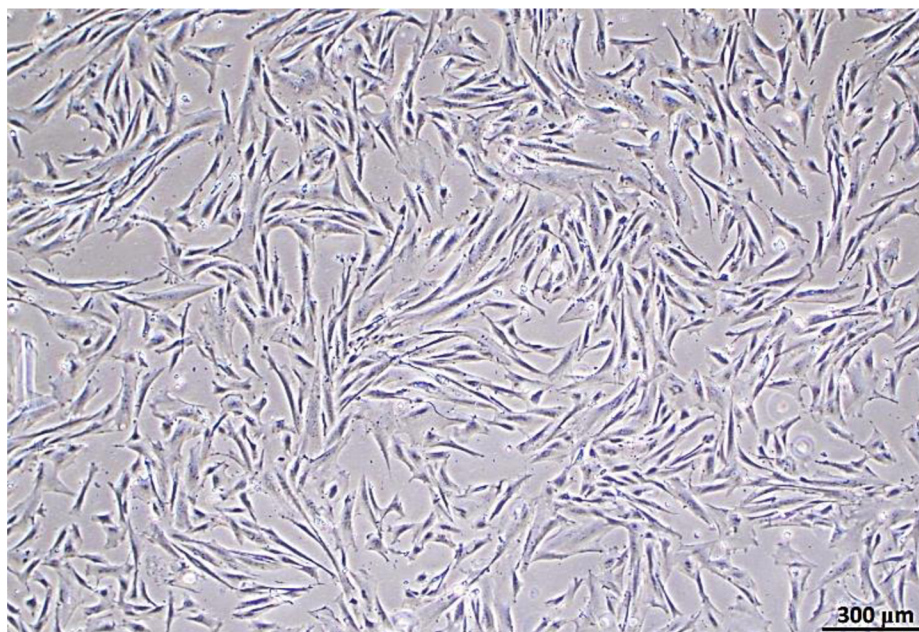
Izolace MSCs probíhala za aseptických podmínek v laminárním boxu. Separace buněk byla provedena na principu gradientové centrifugace, kdy byla kostní dřev vrstvena na Histopaque v poměru 1,5 : 1. Poté byl roztok centrifugován 30 minut při $835 \times g$ a při laboratorní teplotě. Následně byl odebrán prstenec mononukleárních buněk do nové centrifugační zkumavky, bylo přidáno 10 ml PBS a byla provedena 10minutová centrifugace při $371 \times g$ a při laboratorní teplotě. Po centrifugaci izolovaných MSCs byl slit supernatant, pelet buněk byl resuspendován v 1 ml kultivačního média pro MSCs a přenesen do kultivačních lahví, do kterých bylo přidáno kultivační médium pro MSCs do celkového objemu 10 ml.

3.2.1.2 Izolace MSCs z tukové tkáně

Tuková tkáň o celkové hmotnosti 3 g byla promyta v roztoku PBS s 2% Penicilin-Streptomycin, rozmělněna chirurgickými nůžkami na Petriho misce a přenesena do centrifugační zkumavky, kde bylo připraveno 10 ml roztoku kolagenasy ($2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) v Alpha-MEM. Poté byla tuková tkáň ponechána 60 minut při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v inkubované třepačce. Naštěpená stromální vaskulární frakce (SVF) byla přefiltrována přes buněčné sítko do zkumavky a následně byl přidán Alpha-MEM pro zpomalení štěpné reakce. Poté proběhla 5minutová centrifugace při $371 \times g$ a při laboratorní teplotě. Po centrifugaci izolovaných MSCs byl slit supernatant, pelet buněk SVF byl resuspendován v 1 ml kultivačního média pro MSCs a přenesen do kultivačních lahví, do kterých bylo přidáno kultivační médium pro MSCs do celkového objemu 10 ml.

3.2.2 Kultivace MSCs

Izolované MSCs byly kultivovány v 6 kultivačních lahvích o velikosti 75 cm^2 v inkubátoru při $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 a vlhkosti $> 90 \%$. Po 24 hodinách kultivace byly neadherující buňky spolu s médiem odstraněny a následně bylo k buňkám, které byly přilnuty ke dnu kultivační lahve, přidáno čerstvé kultivační médium pro MSCs, které bylo pravidelně měněno po 72 hodinách kultivace. Růst MSCs byl průběžně kontrolován pod inverzním mikroskopem. Když bylo pokryto více než 80 % plochy dna kultivační lahve MSCs, viz obr. 5, tak bylo potřeba provést pasáž. Nejdříve bylo slito kultivační médium a následně byly MSCs v kultivačních lahvích propláchnuty PBS. Do každé kultivační lahve byly přidány 3 ml trypsin / EDTA 1x, aby došlo k uvolnění adherovaných MSCs ode dna kultivačních lahví. Kultivační lahve byly následně ponechány 10 minut v inkubátoru. Po uplynutí 10 minut byly kultivační lahve vyjmuty z inkubátoru a k buňkám bylo přidáno 10 ml PBS pro zastavení trypsinizace. Byla provedena 10minutová centrifugace při $371 \times g$ a při laboratorní teplotě. Poté byl odlit supernatant a pelet s buňkami byl resuspendován v 1ml kultivačního média pro MSCs. Počet a viabilita buněk byly stanoveny pomocí přístroje CASY cell counter (viz kapitola 3.2.3). Podle počtu MSCs byla buněčná suspenze rozdělena do tolika kultivačních lahví, aby byla minimální hustota po nasazení $5000 \text{ buněk} / \text{cm}^2$; tzn. $0,4 \times 10^6 \text{ buněk} / 1 \text{ kultivační láhev}$ o ploše 75 cm^2 . Pro získání dostatečného množství MSCs bylo potřeba provést kultivaci ve 3 pasážích.

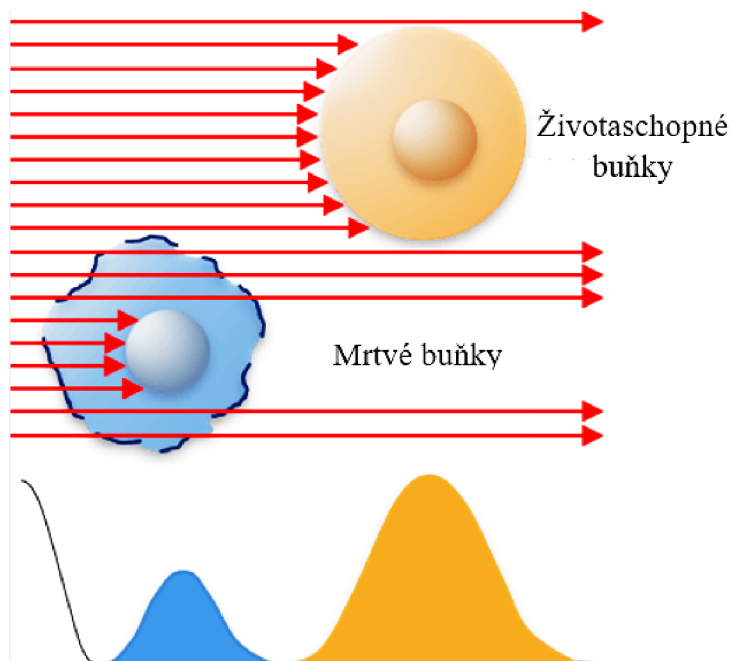


Obr. 5: Konfluence psích MSCs při 80 %. Zvětšení 40×.

Buněčná suspenze pro následné experimenty byla připravena stejným způsobem, jakým bylo provedeno pasážování MSCs, pouze s tím rozdílem, že na závěr byly buňky resuspendovány v PBS namísto kultivačního média pro MSCs a ponechány ve zkumavkách pro další experimenty.

3.2.3 Stanovení počtu a viability buněk

Počet a viabilita MSCs byly stanoveny pomocí přístroje CASY cell counter. Počítadlo buněk CASY je využíváno k počítání buněk založenému na bázi měření velikosti částic a měření odporu buněčné suspenze vystavené slabému elektrickému napětí při průchodu měřicím otvorem v kapiláře. Živé buňky mají neporušenou buněčnou membránu, která poskytuje ochranu před elektrickým proudem. Naopak cytoplazmatická membrána mrtvých buněk postrádá ochrannou bariéru, elektrický proud projde až k jádru buňky, proto jsou mrtvé buňky detekovány jako menší, viz obr. 6 [URL 1].



Obr. 6: Stanovení počtu a viability buněk pomocí přístroje CASY cell counter. Převzato a upraveno podle [URL 1].

3.2.3.1 Postup stanovení počtu a viability buněk

Do objemu 10 ml izotonického pufru CASY-ton v měřicí nádobě CASY-cup bylo napipetováno 100 μ l buněčné suspenze MSCs. Přístrojem CASY cell counter byla stanovena viabilita buněk uvedená v procentech a počet buněk v 1 ml pufru CASY-ton, který byl přepočítán na celkový objem buněčné suspenze MSCs, čímž byl zjištěn celkový počet buněk.

3.2.4 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je využívána pro analýzu fyzikálních a chemických parametrů buněk, nebo k identifikaci buněčných typů uvnitř smíšené populace během jejich průchodu laserovým paprskem. Umožňuje typizaci buněčných populací využitím reakce antigen-protilátka. Vizualizace této reakce je zajištěna označením protilátky fluorescenčním barvivem (např. FITC, PE, APC atd.).

Průtokový cytometr je složen ze 3 vzájemně propojených částí – fluidní, optické a elektronické. Pomocí fluidního systému je zajištěn transport částic ze suspenze buněk pod tlakem do průtokové komory, kde dochází k jejich rozdělení na jednotlivé buňky a analýze pomocí monochromatického laseru. Po průchodu částice ozářené monochromatickým laserem zaznamenávají detektory dva typy rozptylů – přímý rozptyl

(forward scatter, FSC) a boční rozptyl (side scatter, SSC). FSC je přímo úměrný velikosti buňky a SSC odpovídá vnitřní struktuře (granularitě) buňky (Šinkorová a Zárbynická, 2008). Kromě parametrů lomu a rozptylu světla je také detektory měřena intenzita fluorescence. Kvůli přirozené schopnosti fluorescence buněk, autofluorescenci, a jejího odlišení od fluorescenčního značení buněk se používá izotypová kontrola. Díky tomu je možné sledovat emisi fluorescenčně značených protilátek vázaných k antigenu na povrchu, nebo uvnitř buňky.

3.2.4.1 Fenotypizace MSCs

MSCs byly resuspendovány v 0,5 ml PBS a následně zhomogenizovány na orbitální třepače. Vzorky byly následně rozpipetovány po 100 μ l do mikrozkušavek. K vzorkům bylo přidáno 5 μ l příslušné protilátky, nebo 5 μ l izotypové kontroly značené fluorescenčním barvivem, v jedné mikrozkušavce byly ponechány jako kontrola MSCs bez fluorescenčního barviva. Vzorky byly mírně zhomogenizovány a inkubovány 30 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace byl k vzorkům přidán 1 ml PBS na promytí nenavázaných protilátek, nebo fluorescenčních barviv, a následně byly MSCs centrifugovány po dobu 5 minut při $185 \times g$ a při laboratorní teplotě. Poté byl odstraněn pipetou veškerý PBS. Pelety buněk na dnech mikrozkušavek byly zhomogenizovány v 0,5 ml nově přidaného PBS, následně bylo odstříhnuto víčko mikrozkušavek a vzorky byly připraveny do stojánku na měření.

3.2.5 Kokultivace MSCs s THP-1 buněčnou linií

THP-1 buněčná linie o celkové koncentraci $0,5 \times 10^6$ buněk / jamka byla diferencována na makrofágy přidáním 50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ forbol 12-myristát 13-acetátu (PMA) do 3 ml kultivačního média pro MSCs, buňky byly následně kultivovány 72 hodin v inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti > 90 %. Poté bylo médium pro MSCs odstraněno a nahrazeno za kultivační médium pro THP-1, kde byly buňky kultivovány 24 hodin v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂, vlhkost > 90 %), následně byl experiment rozvržen podle tab. 1. Makrofágy byly aktivovány přidáním lipopolysacharidu z *Pseudomonas aeruginosa* (LPS) pouze v některých jamkách. Dále byly do vybraných jamek přidány MSCs v poměru 1 : 1, nebo v poměru 1 : 2. Do samostatné jamky byly přidány 3 ml kondicionovaného média (KM) připraveného kultivováním $0,5 \times 10^6$ MSCs ve 3 ml kultivačního média pro THP-1, kdy po 24 hodinách kultivace v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂, vlhkost > 90 %) byly MSCs z kultivačního média odstraněny centrifugací (10 minut, $371 \times g$, laboratorní teplota), čímž bylo získáno KM s obsahem sekretovaných

bioaktivních látek od MSCs. Jako negativní kontrola byly použity diferencované neaktivované buňky THP-1. Jako pozitivní kontrola byly použity diferencované aktivované buňky THP-1. Všechny varianty byly napipetovány do 6jamkových kultivačních destiček a byly kultivovány po v inkubátoru po dobu 24, 48 a 72 hodin při 37 °C, 5 % CO₂ a vlhkosti > 90 %. Po uplynutí doby kultivace bylo vždy odebráno z jamek kultivačních destiček za aseptických podmínek v laminárním boxu 500 µl kultivačního média do mikrozkmavek. Kultivační médium bylo centrifugováno 5 minut při 371 × g a při laboratorní teplotě kvůli odstranění všech buněk z kultivačního média. Tímto způsobem byly připraveny vzorky pro následné stanovení hladiny IL-6 imunochemickou technikou ELISA.

Pro ověření validity výsledků byl experiment opakován po dobu 24 a 48 hodin kultivace a zároveň rozšířen. Aby bylo ověřeno, že pozorovaný efekt je způsoben imunomodulačními vlastnostmi specifickými pro MSCs, byl experiment rozšířen o kokultivaci diferencovaných aktivovaných buněk THP-1 s buňkami NHDF v poměru 1 : 1, viz tab. 2. Dále bylo porovnáváno, zda MSCs izolované z tukové tkáně a z kostní dřeně budou mít rozdílný vliv na modulaci hladiny IL-6.

Tab. 1: Rozvržení kokultivace MSCs a KM z tukové tkáně s THP-1 buněčnou linií

Jamka na destičce	THP-1 ($0,5 \times 10^6$)	MSCs z tukové tkáně / KM	LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
1	+	-	-
2	+	-	+
3	+	KM	+
4	+	1 : 1	+
5	+	1 : 2	+

Tab. 2: Rozvržení kokultivace NHDF s THP-1, MSCs z tukové tkáně / kostní dřeně s THP-1 a KM s THP-1

Jamka na destičce	THP-1 ($0,5 \times 10^6$)	NHDF ($0,5 \times 10^6$)	MSCs z kostní dřeně / tukové tkáně / KM	LPS ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
1	+	-	-	-
2	+	-	-	+
3	+	-	KM	+
4	+	-	1 : 1	+
5	+	-	1 : 2	+
6	+	+	-	+

3.2.6 Sendvičová ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je imunochemická technika, která je využívána ke kvantitativnímu stanovení antigenů. Principem sendvičové ELISY je specifická interakce antigenu se dvěma protilátkami. První protilátka, která je navázaná na stěnách mikrotitrační destičky, kde následně nekompetitivně reaguje se stanovovaným antigenem do té doby, než se v roztoku ustanoví rovnováha. Poté se nenavázané složky odmyjí a přidá se druhá protilátka s kovalentně navázaným enzymem. Po následné inkubaci a promytí jamek se reakce vizualizuje přidáním chromogenního substrátu, který je štěpen enzymem kovalentně navázaným na druhou protilátku. Posledním krokem je zastavení reakce a fotometrické měření vzniklé barevné reakce (Bartůňková et al., 2011)

3.2.6.1 Stanovení hladiny IL-6 pomocí sendvičové ELISY

Den před měřením hladiny IL-6 byl naředěn do 9 ml destilované vody blokovací pufr 10x (1 ml) a následně byla přidána záchytná protilátka proti lidskému IL-6 250x (40 μl). Poté bylo nanášeno do 96jamkové mikrotitrační destičky 100 μl připraveného roztoku / jamka. Mikrotitrační destička byla inkubována přes noc v lednici při 4 °C.

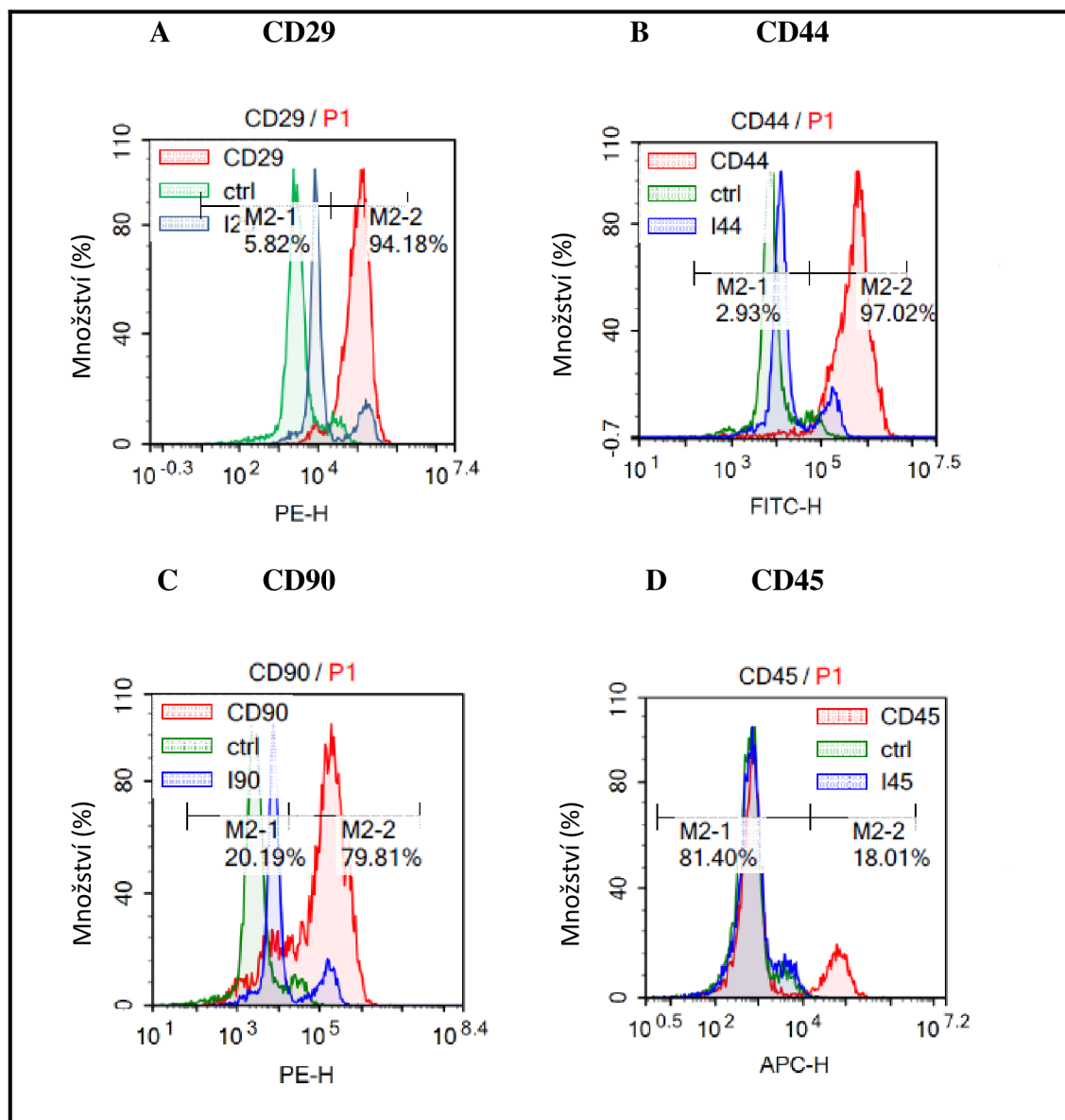
Následující den byla mikrotitrační destička 1x promyta PBS s přidavkem 0,05% Tween -20 pomocí promývačky. Po promytí mikrotitrační destičky byl zásobní ředící roztok 5x naředěn v demineralizované vodě a byla provedena blokáce nanášením 200 μl ředícího roztoku / jamka. Mikrotitrační destička byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace ředícího roztoku byla mikrotitrační destička 1x promyta. Byl připraven standard a koncentrační řada s ředícím faktorem 2. Poté bylo nanášeno v duplikátu 100 μl ředícího roztoku sloužícího jako blank, standardu, vzorků

z koncentrační řady a odebraných vzorků (viz kapitoly 3.2.5 a 3.2.6). Mikrotitrační destička byla inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace byla mikrotitrační destička 1x promyta. Poté byla 250x zředěna detekční protilátka proti lidskému IL-6 s nekovalentně navázaným biotinem (10 ml ředícího roztoku a 40 μ l detekční protilátky) a následně bylo nanášeno 100 μ l zředěné detekční protilátky / jamka. Mikrotitrační destička byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace detekční protilátky byla mikrotitrační destička 1x promyta. Byla přichystána 250x ředěná Streptavidin-křenuv peroxidasa (EC 1.11.1.7, Streptavidin-horseradish peroxidase, Streptavidin-HRP, 10 ml ředícího roztoku a 40 μ l Streptavidin-HRP) a následně bylo přidáno 100 μ l naředěné Streptavidin-HRP / jamka. Mikrotitrační destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. Mikrotitrační destička byla poté 1x promyta. Následně bylo nanášeno do každé jamky 100 μ l substrátu tetrametylbenzidinu, který se nechal 3 až 5 minut inkubovat ve tmě do charakteristického modrého zbarven. Jakmile se objevilo modr zbarven na dně jamky, bylo přidáno 50 μ l zastavovacího roztoku (H_2SO_4 , 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) / jamka. V posledním kroku byla změřena absorbane při 450 nm pomocí Multimode plate reader EnSight.

4 VÝSLEDKY

4.1 Identifikace psích MSCs povrchovými markery

Kmenové buňky izolované z biologického materiálu splnily stanovená kritéria kmenovosti pro psí MSCs. Pro markery CD29, CD44, CD90 byly psí MSCs pozitivní a pro marker CD45 negativní, viz obr. 7.

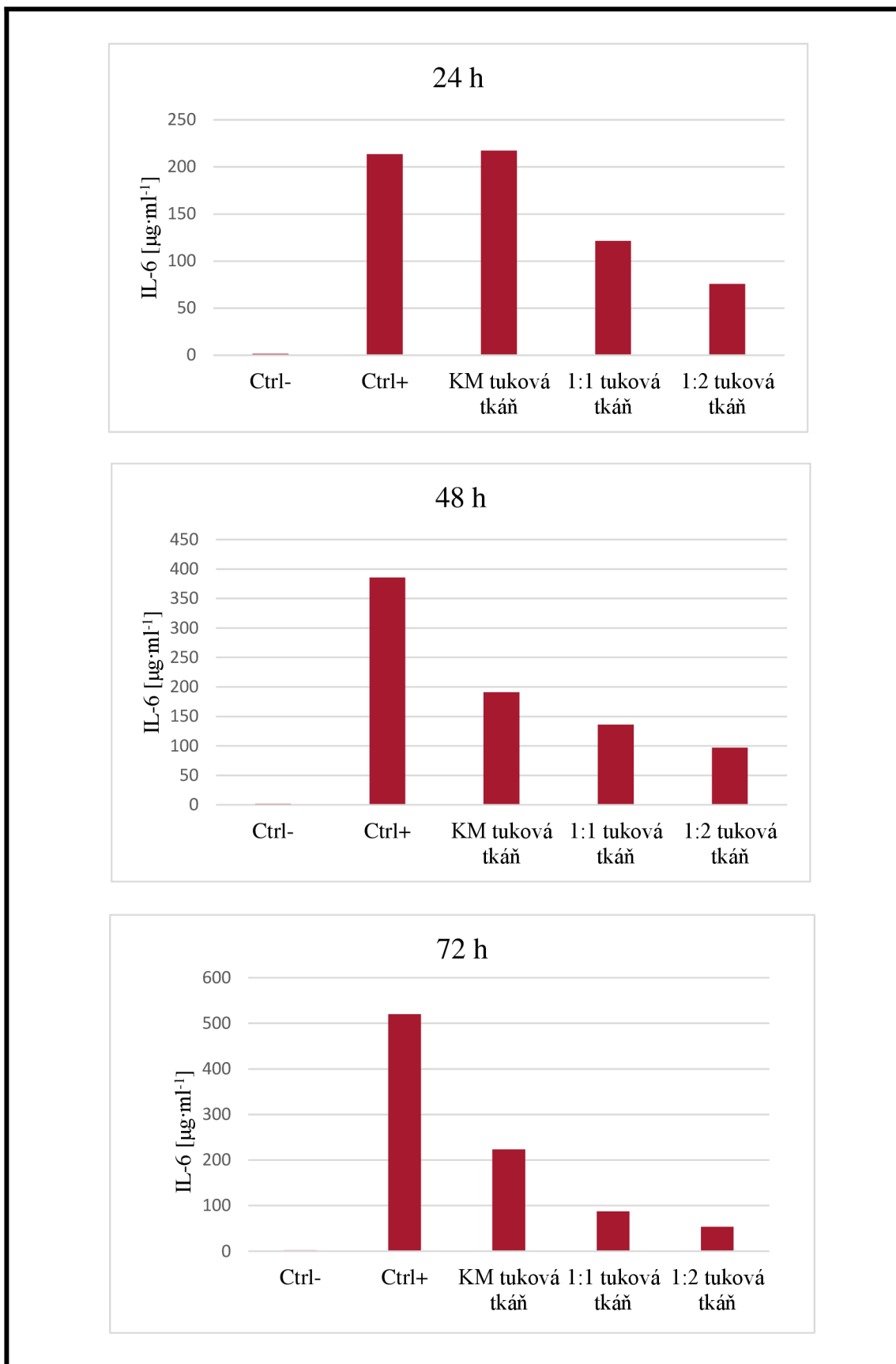


Obr. 7: Fenotypizace psích MSCs pomocí průtokové cytometrie. Červeně označený histogram představuje stanovovaný CD marker MSCs (A-D), zeleně je označena negativní kontrola obsahující MSCs bez fluorescenčního barviva a modře je označena izotypová kontrola. Označení M2-1 vyjadřuje procentuální zastoupení buněčné populace negativní pro stanovovaný marker (A-D) a M2-2 vyjadřuje procentuální zastoupení buněčné populace pozitivní pro stanovovaný marker (A-D).

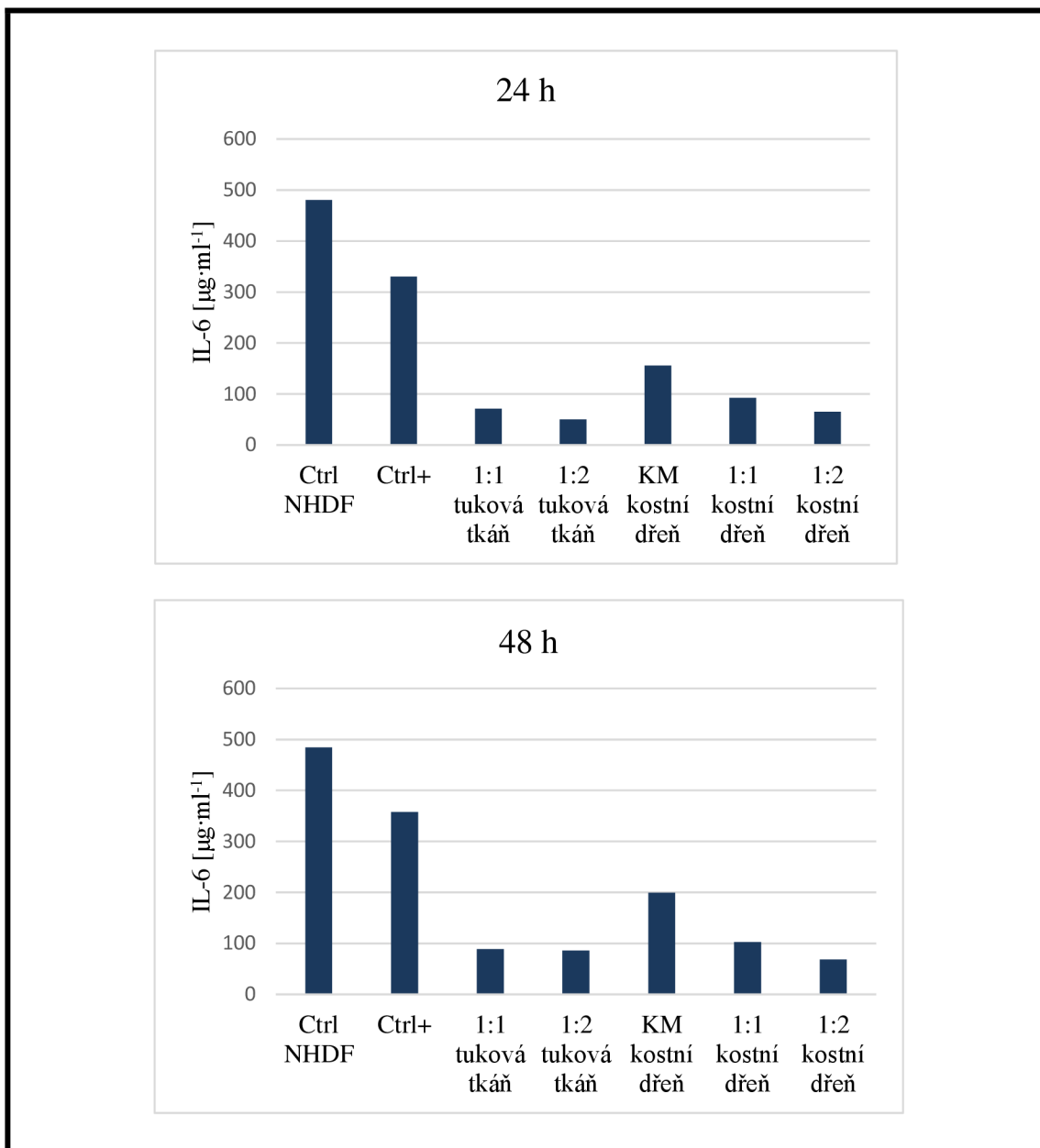
4.2 Stanovení hladiny prozánětlivého cytokinu IL-6

Hladina IL-6 byla v provedených experimentech posuzována vzhledem k pozitivní kontrole („Ctrl+“), k diferencovaným aktivovaným buňkám THP-1. Aktivací buněk THP-1 na makrofágy pomocí LPS došlo k indukci hladiny IL-6. Hladina IL-6 u aktivovaných makrofágů byla v první sérii experimentů snížena MSCs izolovanými z tukové tkáně, a to ve všech sledovaných časech kultivace (24, 48, 72 h), viz obr. 8. Pokles hladiny IL-6 vykazuje přímou úměrnost na použitém množství MSCs, kdy v rámci kokultivace THP-1 a MSCs v poměru 1 : 2 byl zaznamenán vyšší vliv MSCs na snížení hladiny IL-6, než při kokultivaci v poměru 1 : 1. Tento trend bylo možné pozorovat ve všech sledovaných časech kultivace. Vliv bioaktivních látek KM na pokles hladiny IL-6 bylo možné pozorovat až po 48 a 72 hodinách kultivace. Validitu naměřených výsledků potvrdila negativní kontrola – u neaktivovaných diferencovaných buněk THP-1 nebyl detekován IL-6.

Ve druhé sérii experimentů byl porovnáván vliv MSCs izolovaných z tukové tkáně a kostní dřeně. Po 24 a 48 hodinách kultivace bylo pozorováno snížení hladiny IL-6 MSCs izolovaných z obou tkání, viz obr. 9. Obdobně jako u první série experimentů byl pokles hladiny IL-6 přímo úměrný použitému množství MSCs izolovaných z tukové tkáně i z kostní dřeně. Oproti první sérii experimentů se projevil vliv bioaktivních látek KM z kultivace MSCs izolovaných z kostní dřeně na snížení hladiny IL-6 u všech sledovaných časů kultivace (24 a 48 h). KM z kultivace MSCs izolovaných z tukové tkáně nebylo možné vyhodnotit z důvodu kontaminace média pro THP-1 v jamkách kultivační destičky. Jako pozitivní kontrola byly použity jako v první sérii experimentů diferencované aktivované buňky THP-1. Pro ověření imunomodulačních vlastností MSCs byla použita kontrola s buňkami NHDF, u kterých nebyl předpokládán žádný imunomodulační efekt.



Obr. 8: Porovnání hladiny IL-6 při kokultivaci MSCs s THP-1 a KM s THP-1 v časech 24, 48 a 72 hodin kokultivace. Ctrl- = negativní kontrola; Ctrl+ = pozitivní kontrola.



Obr. 9: Porovnání hladiny IL-6 při kokultivaci NHDF s THP-1, MSCs z tukové tkáně / kostní dřevě s THP-1 a KM s THP-1 v časech 24 a 48 hodin kokultivace. Ctrl NHDF = kontrola s buňkami NHDF, Ctrl+ = pozitivní kontrola.

5 DISKUSE

V provedených experimentech této bakalářské práce byly ověřovány imunomodulační vlastnosti MSCs *in vitro* sledováním modulační hladiny prozánětlivého cytokinu IL-6 těmito buňkami. Pro kokultivaci s MSCs byly použity buňky THP-1 buněčné linie, která je používána jako buněčný model pro studium zánětlivých a protizánětlivých procesů probíhajících v těle (Park et al., 2007). Při kokultivaci MSCs s aktivovanými makrofágy pomocí LPS došlo v provedených experimentech této bakalářské práce ke snížení hladiny IL-6 MSCs. Tímto výsledkem bylo prokázáno, že MSCs vykazují i v tomto základním buněčném modelu schopnost modulační imunitní odpovědi. Předpokládá se, že schopnost imunomodulační MSCs je zprostředkována především pomocí přímého kontaktu s makrofágy a parakrinní aktivity (Wang et al., 2018; Cao et al., 2020). Kompatibilitu s naměřenými výsledky v této bakalářské práci potvrzuje řada studií, které se zabývaly pozorováním vlivu MSCs na modulační hladiny IL-6 (Nemét et al., 2009; Maggini et al., 2010; Svobodová et al., 2012). Na druhé straně ve studii Kim a Hematti (2009) došlo k zaznamenání zvýšené hladiny IL-6 při kokultivaci aktivovaných makrofágů s MSCs. Ke zvýšení hladiny IL-6 mohlo v této studii dojít kvůli použití metodiky intracelulárního barvení, která představuje výhodu oproti stanovení hladin cytokinů imunochemickou technikou ELISA, neboť má tato metodika schopnost zaznamenat i hladiny cytokinů sekretované samotnými MSCs. Ve studii Pig et al. (2018) provedené *in vivo* na koňském modelu došlo rovněž po injekčním podání alogenních, autologních a xenogenních MSCs k vzestupu hladiny IL-6 u všech testovaných variant MSCs. V této studii byla měřena hladina IL-6 pouze prostřednictvím imunochemické techniky ELISA, zvýšení hladiny IL-6 mohlo být způsobeno jednak MSCs, a jednak imunokompetentními buňkami.

Různé výsledky vlivu KM na snížení hladiny IL-6 v provedených experimentech této bakalářské práce mohly být způsobeny nízkým obsahem bioaktivních látek, které byly získány pouze 24hodinovou kultivací MSCs. Pro jednoznačné prokázání imunomodulační MSCs prostřednictvím sekretovaných bioaktivních látek by bylo potřeba provést další experimenty, kde by bylo sledováno KM jednak z různého množství kultivovaných MSCs, a jednak z různých časů kultivace. Ačkoliv naměřenými výsledky této bakalářské práce nebyly přímo prokázány imunomodulační vlastnosti MSCs skrze KM, mnoho studií dokládá schopnost imunomodulační MSCs právě prostřednictvím sekretovaných bioaktivních látek (Takahashi et al., 2006; Yao et al., 2015; Jiang et al., 2017). Na imunomodulační a regenerační efekt KM v bezbuněčné terapii poukázala

studie Linero et al. (2014), která potvrdila srovnatelné účinky KM a samotných MSCs při regeneraci chirurgicky vytvořených defektů v králičích čelistech.

Ve druhé sérii experimentů byl porovnáván vliv MSCs izolovaných ze dvou různých tkání od psích dárců, kostní dřeně a tukové tkáně, na snížení hladiny IL-6. Jelikož je odběr kostní dřeně řazen mezi invazivní zákroky a procentuální zastoupení MSCs je v kostní dřeni velmi nízké (0,001 – 0,01 %), bylo potřeba hledat jiné alternativnější zdroje pro izolaci MSCs (Pittenger et al., 1999). Tuková tkáň se jeví jako slibná alternativa kostní dřeně pro studium imunomodulačních vlastností MSCs, protože odběr tukové tkáně je prováděn při rutinně prováděných operacích a navíc také představuje méně invazivní zákrok pro pacienta. V rámci provedených experimentů této bakalářské práce nebyl zaznamenán rozdíl mezi MSCs izolovaných z kostní dřeně a tukové tkáně v modulaci hladiny IL-6. Tento výsledek naznačuje, že by mohly MSCs izolované z tukové tkáně vykazovat srovnatelný imunomodulační účinek na snížení hladin prozánětlivých cytokinů jako MSCs izolované z kostní dřeně. Na druhé straně studie Bortolotti et al. (2015) poukazuje na rozdílný terapeutický vliv MSCs izolovaných z kostní dřeně a MSCs izolovaných z tukové tkáně v léčbě ischemie končetiny u myši. V této studii byly lépe vyhodnoceny MSCs izolované z kostní dřeně, které vykazovaly mnohem průkaznější terapeutické účinky v podpoření tvorby nových arteriol v končetinách myších modelů ve srovnání s MSCs izolovaných z tukové tkáně.

6 ZÁVĚR

MSCs se díky svým imunomodulačním a regeneračním vlastnostem staly nadějným terapeutickým nástrojem v léčbě mnoha onemocnění a v obnově poškozených tkání. V teoretické části bakalářské práce byly shrnuty poznatky týkající se imunomodulačních vlastností MSCs. Byl kladen důraz především na interakci MSCs s buňkami imunitního systému a na parakrinní a imunosupresivní aktivitu těchto buněk.

V experimentální části bakalářské práce byly nejdříve izolovány MSCs z biologického materiálu od psích dárců a následně kultivovány. U kultivovaných MSCs byly hodnoceny charakteristické povrchové markery pro psy pomocí průtokové cytometrie, čímž bylo ověřeno, že izolaci z biologického materiálu byly skutečně získány psí MSCs. Poté byly u MSCs ověřeny imunomodulační vlastnosti *in vitro* stanovením hladiny prozánětlivého cytokinu IL-6 imunochemickou technikou sendvičové ELISY s detekcí pomocí systému Streptavidin-biotin. U kokultivace buněk NHDF s THP-1 buněčnou linií nebylo zaznamenáno snížení hladiny IL-6 v médiu. Tímto výsledkem byla potvrzena modulace IL-6 MSCs, a tím i imunomodulační vlastnosti těchto buněk. Výsledky z provedených experimentů v této bakalářské práci poukazují na potenciální vhodnost použití MSCs v klinické praxi. Je nutné podotknout, že ačkoliv byla experimenty *in vitro* v této bakalářské práci a v řadě studií prokázána terapeutická vhodnost využití MSCs v klinické praxi, je stále potřeba provést rozsáhlé studie *in vivo* k potvrzení vhodnosti použití MSCs v rozsáhlém terapeutickém měřítku.

7 LITERATURA

- [URL1] OLS OMNI Life Science. <https://www.ols-bio.de/products/cell-counter-casy> (28.9.2021).
- Adler, J. T., Redfield, R. R., Kaufman, D. B., & Odorico, J. S. (2019). Isolated pancreas transplantation: Is rank list position related to outcomes of imported grafts? *American Journal of Transplantation*, 19(11), 3124-3130. <https://doi.org/10.1111/ajt.15387>
- Aggarwal, S., Pittenger, M. F., Wang, D. D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W. J., Sun, L., Shi, S., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses: Common features and peculiarities. *Blood*, 105(4), 1815-1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
- Aust, L., Devlin, B., Foster, S. J., Halvorsen, Y. D. C., Hicok, K., du Laney, T., Sen, A., Willingmyre, G. D., Gimble, J. M., Horwitz, E. M., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2004). Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates: Common features and peculiarities. *Cytotherapy*, 6(1), 7-14. <https://doi.org/10.1080/14653240310004539>
- Bang, O. Y., Lee, J. S., Lee, P. H., & Lee, G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57(6), 874-882. <https://doi.org/10.1002/ana.20501>
- Bartůňková, J., Paulík, M. & kolektiv (2011). *Vyšetřovací metody v imunologii* (2., přepracované a doplněné vydání). Grada Publishing, s. 48-49. ISBN 978-80-247-7089-5.
- Boberg, E., Bahr, L., Afram, G., Lindström, C., Ljungman, P., Heldring, N., Petzelbauer, P., Garming Legert, K., Kadri, N., & Le Blanc, K. (2020). Treatment of chronic GvHD with mesenchymal stromal cells induces durable responses: A phase II study. *Stem Cells Translational Medicine*, 9(10), 1190-1202. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0099>
- Bortolotti, F., Ukovich, L., Razban, V., Martinelli, V., Ruozi, G., Pelos, B., Dore, F., Giacca, M., Zacchigna, S., Horwitz, E. M., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2015). In Vivo Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells Depends on the Source and the Isolation Procedure: useful for immune-mediated diseases? *Stem Cell Reports*, 4(3), 332-339. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.001>
- Calloni, R., Viegas, G. S., Türck, P., Bonatto, D., Pegas Henriques, J. A., Carvalho, P. P., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2014). Mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms: useful for immune-mediated diseases?. *Cytotherapy*, 16(1), 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.010>
- Cao, C., Tarlé, S., Kaigler, D., Viegas, C. A., Dias, I. R., Carvalho, P. P., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2020). Characterization of the immunomodulatory properties of alveolar bone-derived mesenchymal stem cells: useful for immune-mediated diseases? *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 130-156. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01605-x>
- Casiraghi, F., Azzollini, N., Cassis, P., Imberti, B., Morigi, M., Cugini, D., Cavinato, R. A., Todeschini, M., Solini, S., Sonzogno, A., Perico, N., Remuzzi, G., & Noris, M. (2008). Pretransplant Infusion of Mesenchymal Stem Cells Prolongs the Survival of a Semiallogeneic Heart Transplant through the Generation of Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 181(6), 3933-3946. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3933>

- da Silva Meirelles, L., Pérez, L. M., Gálvez, B. G., Viegas, C. A., Dias, I. R., Carvalho, P. P., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2016). Mesenchymal stem cells and their relationship to pericytes: useful for immune-mediated diseases? *Frontiers in Bioscience*, 21(1), 130-156. <https://doi.org/10.2741/4380>
- Dias, I. E., Pinto, P. O., Barros, L. C., Viegas, C. A., Dias, I. R., Carvalho, P. P., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2019). Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? *BMC Veterinary Research*, 15(1), 315-317. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2087-2>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dutta, R., Trapp, B. D., Polley, O., Sifringer, M., Felderhoff-Mueser, U., Bühner, C., Tse, H. -F., Fu, Q. -L., Lian, Q., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2007). Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration. *Neurology*, 68(22, Supplement 3), S22-S31. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000275229.13012.32>
- Fan, J., Varshney, R. R., Ren, L., Cai, D., Wang, D. -A., Li, L., Tse, H. -F., Fu, Q. -L., Lian, Q., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2009). Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(1), 75-86. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0586>
- Fan, L., Hu, C., Chen, J., Cen, P., Wang, J., Li, L., Tse, H. -F., Fu, Q. -L., Lian, Q., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2016). Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells: current status and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 789-798. <https://doi.org/10.3390/ijms17050650>
- Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., Baldini, P. M., Prat, M., & Di Nardo, P. (2006). Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Migration, and Differentiation. *Stem Cells*, 24(1), 23-33. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0176>
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
- Fujii, S., Miura, Y., Fujishiro, A., Shindo, T., Shimazu, Y., Hirai, H., Tahara, H., Takaori-Kondo, A., Ichinohe, T., & Maekawa, T. (2018). Graft-Versus-Host Disease Amelioration by Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Is Associated with Peripheral Preservation of Naive T Cell Populations. *Stem Cells*, 36(3), 434-445. <https://doi.org/10.1002/stopka.2759>
- Funes, S. C., Rios, M., Escobar-Vera, J., Kalergis, A. M., Chen, L., Ji, H. -L., Tse, H. -F., Fu, Q. -L., Lian, Q., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2018). Implications of macrophage polarization in autoimmunity: current status and future prospects. *Immunology*, 154(2), 186-195. <https://doi.org/10.1111/imm.12910>

- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. -L., Tse, H. -F., Fu, Q. -L., Lian, Q., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *BMC Cancer*, 7(1), e2062-e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., Michiels, C., Dalton, N. D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K. L., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide: Mechanism and Functions. *BMC Cancer*, 15(1), 593-604. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1546-9>
- Gordon, S., Martinez, F. O., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N. D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K. L., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, 32(5), 593-604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Guimarães-Camboa, N., Cattaneo, P., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N. D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K. L., Stallcup, W. B., Chen, J., Evans, S. M., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2017). Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo: Clinical Promise and Open Questions. *Cell Stem Cell*, 20(3), 345-359.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.006>
- György, B., Hung, M. E., Breakefield, X. O., Leonard, J. N., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T. -C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2015). Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles: Clinical Promise and Open Questions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55(1), 439-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124630>
- Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., & Spíšek, R. (2013). *Základy imunologie* (5. vydání). Stanislav Juhaňák – Triton, s. 52-55, 188-189. ISBN 978-80-7387-713-2.
- Chatterjee, D., Tufa, D. M., Baehre, H., Hass, R., Schmidt, R. E., Jacobs, R., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., Min, W., McLendon, R. E., Rich, J. N., & Bao, S. (2014). Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *Blood*, 123(4), 594-595. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-524827>
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., Min, W., McLendon, R. E., Rich, J. N., & Bao, S. (2013). Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *Cell*, 153(1), 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.021>
- in 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. H. (2004). Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *STEM CELLS*, 22(7), 1338-1345. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>
- Jiang, W., Xu, J., López-Ruiz, E., & Gálvez-Martín, P. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *Cell Proliferation*, 53(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>
- Jiang, Z., Liu, G., Meng, F., Wang, W., Hao, P., Xiang, Y., Wang, Y., Han, R. F., Li, F., Wang, L., Li, J., Ma, C., Guo, Y., Mezey, É., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2017). Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes: A phase II study. *British Journal of Ophthalmology*, 101(11), 1583-1590. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-310012>

- Kassem, M., Kristiansen M. a M. Abdallah B. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2004, 95(5), 209-214. ISSN 1742-7835. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-7843.2004.pto950502.x
- Katsuda, T., Tsuchiya, R., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takagaki, K., Oki, K., Takeshita, F., Sakai, Y., Kuroda, M., & Ochiya, T. (2013). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Scientific Reports*, 3(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep01197>
- Katuchova, J., Harvanova, D., Spakova, T., Kalanin, R., Farkas, D., Durny, P., Rosocha, J., Radonak, J., Petrovic, D., Siniscalco, D., Qi, M., Novak, M., Kruzliak, P., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2015). Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus: Preliminary results. *Endocrine Pathology*, 26(2), 95-103. <https://doi.org/10.1007/s12022-015-9362-y>
- Kim, J., & Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*, 37(12), 1445-1453. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.09.004>
- Lacitignola, L., Staffieri, F., Rossi, G., Francioso, E., Crovace, A., Kruger, J. M., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2017). Survival of bone marrow mesenchymal stem cells labelled with red fluorescent protein in an ovine model of collagenase-induced tendinitis. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 27(03), 204-209. <https://doi.org/10.3415/VCOT-13-09-0113>
- Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E., Ringden, O., Zhou, H. X., Chen, J., Yang, Y., Xie, J., Li, G., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2003). Mesenchymal Stem Cells Inhibit and Stimulate Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Independently of the Major Histocompatibility Complex: Preliminary results. *Scandinavian Journal of Immunology*, 57(1), 11-20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x>
- Lee, S. J., Vogelsang, G., Flowers, M. E. D., Han, Y., Sun, T., Zhou, H. X., Chen, J., Yang, Y., Xie, J., Li, G., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2003). Chronic graft-versus-host disease: Preliminary results. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 9(4), 215-233. <https://doi.org/10.1053/bbmt.2003.50026>
- Li, L., Jiang, J., Ren, J. -L., Xu, F., Chen, F. -M., Li, A., Chen, J., Yang, Y., Xie, J., Li, G., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2011). Regulatory factors of mesenchymal stem cell migration into injured tissues and their signal transduction mechanisms: Preliminary results. *Frontiers of Medicine*, 5(1), 33-39. <https://doi.org/10.1007/s11684-011-0114-1>
- Li, N., Hua, J., Ren, J. -L., Xu, F., Chen, F. -M., Li, A., Chen, J., Yang, Y., Xie, J., Li, G., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system: Preliminary results. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(13), 2345-2360. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2473-5>
- Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Lu, L., Shi, S., Hou, Y., Zeng, X., Gilkeson, G. S., & Sun, L. (2010). Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(8), 1423-1429. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.123463>
- Liang, J., Zhang, H., Kong, W., Deng, W., Wang, D., Feng, X., Zhao, C., Hua, B., Wang, H., & Sun, L. (2018). Safety analysis in patients with autoimmune disease receiving allogeneic mesenchymal stem cells infusion: a long-term retrospective study, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1053-4>

- Linero, I., Chaparro, O., Camussi, G., Zhang, S., Zhang, X., Xu, J., Chen, J., Yang, Y., Xie, J., Li, G., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2014). Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue in Bone Regeneration: Preliminary results. *PLoS ONE*, 9(9), 171-184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107001>
- Liu, F., Qiu, H., Xue, M., Zhang, S., Zhang, X., Xu, J., Chen, J., Yang, Y., Xie, J., Li, G., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2019). MSC-secreted TGF- β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway: Preliminary results. *Frontiers in Immunology*, 10(1), 171-184. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1447-y>
- Liu, Y., Ju, M., Wang, Z., Li, J., Shao, C., Fu, T., Jing, Y., Zhao, Y., Lv, Z., & Li, G. (2020). The synergistic effect of NELL1 and adipose-derived stem cells on promoting bone formation in osteogenesis imperfecta treatment, 128, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110235>
- Llufriu, S., Sepúlveda, M., Blanco, Y., Marín, P., Moreno, B., Berenguer, J., Gabilondo, I., Martínez-Heras, E., Sola-Valls, N., Arnaiz, J. -A., Andreu, E. J., Fernández, B., Bullich, S., Sánchez-Dalmau, B., Graus, F., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2014). Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: A phase II study. *PLoS ONE*, 9(12), 1190-1202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113936>
- Loza, M. J., McCall, C. E., Li, L., Isaacs, W. B., Xu, J., Chang, B. -L., Gold, J., Jorgensen, C., Figueroa, F., Djouad, F., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2007). Assembly of Inflammation-Related Genes for Pathway-Focused Genetic Analysis: Preliminary results. *PLoS ONE*, 2(10), 171-184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001035>
- Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegría, J., Contreras, R., Nova-Lamperti, E., Tejedor, G., Noël, D., Jorgensen, C., Figueroa, F., Djouad, F., Carrión, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4 CD25 Foxp3 regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells: Preliminary results. *Brain Research Bulletin*, 4(3), 171-184. <https://doi.org/10.1186/s1216>
- MacMillan, M. L., Weisdorf, D. J., Wagner, J. E., DeFor, T. E., Burns, L. J., Ramsay, N. K. C., Davies, S. M., & Blazar, B. R. (2002). Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 8(7), 387-394. <https://doi.org/10.1053/bbmt.2002.v8.pm12171485>
- Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, I. M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Cañones, C., Raiden, S., Vermeulen, M., Geffner, J. R., Neyrolles, O., Star, R. A., Mezey, É., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2010). Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile: A phase II study. *PLoS ONE*, 5(2), 42-49. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009252>
- Makhlough, A., Shekarchian, S., Moghadasali, R., Einollahi, B., Dastgheib, M., Janbabaee, G., Hosseini, S. E., Falah, N., Abbasi, F., Baharvand, H., & Aghdami, N. (2018). Bone marrow-mesenchymal stromal cell infusion in patients with chronic kidney disease: A safety study with 18 months of follow-up. *Cytotherapy*, 20(5), 660-669. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.02.368>

- Marzban, M., Mousavizadeh, K., Bakhshayesh, M., Vousooghi, N., Vakilzadeh, G., Torkaman-Boutorabi, A., Fujimiya, M., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2018). Effect of Multiple Intraperitoneal Injections of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Cuprizone Model of Multiple Sclerosis: Preliminary results. *Iranian Biomedical Journal*, 22(5), 312-321. <https://doi.org/10.29252/ibj.22.5.312>
- Mauri, C., Menon, M., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., Dilloo, D., Fujimiya, M., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2015). The expanding family of regulatory B cells: Preliminary results. *International Immunology*, 27(10), 479-486. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv038>
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., Dilloo, D., Fujimiya, M., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation: Preliminary results. *Blood*, 103(12), 4619-4621. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>
- Mendonça, M. V. P., Larocca, T. F., de Freitas Souza, B. S., Villarreal, C. F., Silva, L. F. M., Matos, A. C., Novaes, M. A., Bahia, C. M. P., de Oliveira Melo Martinez, A. C., Kaneto, C. M., Furtado, S. B. C., Sampaio, G. P., Soares, M. B. P., & dos Santos, R. R. (2014). Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury, 5(6), 1-11. <https://doi.org/10.1186/scrt516>
- Mesples, A., Majeed, N., Zhang, Y., & Hu, X. (2013). Early immunotherapy using autologous adult stem cells reversed the effect of anti-pancreatic islets in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus: Preliminary results. *Medical Science Monitor*, 19, 852-857. <https://doi.org/10.12659/MSM.889525>
- Molendijk, I., Bonsing, B. A., Roelofs, H., Peeters, K. C. M. J., Wasser, M. N. J. M., Dijkstra, G., van der Woude, C. J., Duijvestein, M., Veenendaal, R. A., Zwaginga, J. -J., Verspaget, H. W., Fibbe, W. E., van der Meulen-de Jong, A. E., & Hommes, D. W. (2015). Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 149(4), 918-927. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.014>
- Moloudizargari, M., Govahi, A., Fallah, M., Rezvanfar, M. A., Asghari, M. H., Abdollahi, M., Fujimiya, M., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2021). The mechanisms of cellular crosstalk between mesenchymal stem cells and natural killer cells: Therapeutic implications. *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), 2413-2429. <https://doi.org/10.1002/jcp.30038>
- Munder, M., Eichmann, K., Morán, J. M., Centeno, F., Soler, G., & Modolell, M. (1999). Th1/Th2-Regulated Expression of Arginase Isoforms in Murine Macrophages and Dendritic Cells, 163(7), 3771-3777.
- Musumeci, G., Aiello, F., Szychlinska, M., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P., Mobasher, A., Fujimiya, M., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2015). Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 6093-6112. <https://doi.org/10.3390/ijms16036093>

- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., Mezey, É., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production: A phase II study. *Nature Medicine*, 15(1), 42-49. <https://doi.org/10.1038/nm.1905>
- Neuss, S., Becher, E., Wöltje, M., Tietze, L., & Jahnen-Dechent, W. (2004). Functional Expression of HGF and HGF Receptor/c-met in Adult Human Mesenchymal Stem Cells Suggests a Role in Cell Mobilization, Tissue Repair, and Wound Healing. *STEM CELLS*, 22(3), 405-414. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-405>
- Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., Le Meur, Y., Pers, J. O., Hillion, S., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalha, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2015). B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. *Journal of Autoimmunity*, 59(1), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.02.004>
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., Kim, K. S., Baik, S. K., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalha, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. *Inflammation Research*, 56(1), 45-50. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>
- Park, H. J., Kim, J., Saima, F. T., Rhee, K. -J., Hwang, S., Kim, M. Y., Baik, S. K., Eom, Y. W., Kim, H. -S., Marshak, D. R., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalha, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2018). Adipose-derived stem cells ameliorate colitis by suppression of inflammasome formation and regulation of M1-macrophage population through prostaglandin E₂: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 988-995. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.096>
- Parys, M., Nelson, N., Koehl, K., Miller, R., Kaneene, J. B., Kruger, J. M., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2016). Safety of Intraperitoneal Injection of Adipose Tissue-Derived Autologous Mesenchymal Stem Cells in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 157-163. <https://doi.org/10.1111/jvim.13655>
- Petrou, P., Kassis, I., Levin, N., Paul, F., Backner, Y., Benoliel, T., Oertel, F. C., Scheel, M., Hallimi, M., Yaghmour, N., Hur, T. B., Ginzberg, A., Levy, Y., Abramsky, O., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2020). Beneficial effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation in active progressive multiple sclerosis: A phase II study. *Brain*, 143(12), 3574-3588. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa333>
- Pig, J. H., Ishihara, A., Wellman, M. L., Russell, D. S., & Bertone, A. L. (2018). Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 26(06), 453-460. <https://doi.org/10.3415/VCOT-13-01-0008>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., Du, D. R., Dong, J., Ma, C., Guo, Y., Mezey, É., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells: A phase II study. *Science*, 284(5411), 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Pomahačová, R. & Kalvachová, B. (2013). *Dětská endokrinologie do kapsy* (3., přepracované a doplněné vydání). Mladá fronta a.s., s. 128-135. ISBN 978-80-204-2936-0.

- Ringe, J., Strassburg, S., Neumann, K., Endres, M., Notter, M., Burmester, G. -R., Kaps, C., & Sittinger, M. (2007). Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(1), 135-146. <https://doi.org/10.1002/jcb.21172>
- Rodríguez-Fuentes, D. E., Fernández-Garza, L. E., Samia-Meza, J. A., Barrera-Barrera, S. A., Caplan, A. I., Barrera-Saldaña, H. A., Muroi, K., Ozawa, K., Patey, N., Marincola, F. M., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2021). Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research*, 52(1), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K., Patey, N., Marincola, F. M., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2006). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 109(1), 228-234. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>
- Selleri, S., Bifsha, P., Civini, S., Pacelli, C., Dieng, M. M., Lemieux, W., Jin, P., Bazin, R., Patey, N., Marincola, F. M., Moldovan, F., Zaouter, C., Trudeau, L. -E., Benabdhalla, B., Louis, I., Beauséjour, C., Stroncek, D., Le Deist, F., & Haddad, E. (2016). Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Oncotarget*, 7(21), 30193-30210. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8623>
- Seo, B. -M., Miura, M., Gronthos, S., Mark Bartold, P., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Gehron Robey, P., Wang, C. Y., Shi, S., Li, N., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *The Lancet*, 364(9429), 149-155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
- Shahir, M., Mahmoud Hashemi, S., Asadirad, A., Varahram, M., Kazempour-Dizaji, M., Folkerts, G., Garssen, J., Adcock, I., Mortaz, E., Cui, L., Li, N., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2020). Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 7043-7055. <https://doi.org/10.1002/jcp.29601>
- Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., Li, N., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2008). A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Cell Research*, 18(8), 846-857. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.80>
- Shi, L., Huang, H., Lu, X., Yan, X., Jiang, X., Xu, R., Wang, S., Zhang, C., Yuan, X., Xu, Z., Huang, L., Fu, J. -L., Li, Y., Zhang, Y., Yao, W. -Q., Liu, T., Song, J., Sun, L., Yang, F., et al. (2021). Effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on lung damage in severe COVID-19 patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00488-5>
- Schmidt, N. O., Przylecki, W., Yang, W., Ziu, M., Teng, Y., Kim, S. U., Black, P. M., Aboody, K. S., Carroll, R. S., Yaghmour, N., Hur, T. B., Ginzberg, A., Levy, Y., Abramsky, O., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2005). Brain Tumor Tropism of Transplanted Human Neural Stem Cells Is Induced by Vascular Endothelial Growth Factor: A phase II study. *Neoplasia*, 7(6), 623-630. <https://doi.org/10.1593/neo.04781>

- Slack, Jonathan M. W. (2018). *The Niche. The science of stem cells*. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, Inc., s. 5. ISBN 9781119235231.
- Son, B. -R., Marquez-Curtis, L. A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A. R., Ratajczak, J., Ratajczak, M. Z., Janowska-Wieczorek, A., Carroll, R. S., Yaghmour, N., Hur, T. B., Ginzberg, A., Levy, Y., Abramsky, O., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2006). Migration of Bone Marrow and Cord Blood Mesenchymal Stem Cells In Vitro Is Regulated by Stromal-Derived Factor-1-CXCR4 and Hepatocyte Growth Factor-c-met Axes and Involves Matrix Metalloproteinases: A phase II study. *STEM CELLS*, 24(5), 1254-1264. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0271>
- Sordi, V., Malosio, M. L., Marchesi, F., Mercalli, A., Melzi, R., Giordano, T., Belmonte, N., Ferrari, G., Leone, B. E., Bertuzzi, F., Zerbini, G., Allavena, P., Bonifacio, E., & Piemonti, L. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, 106(2), 419-427. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3507>
- Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., Moretta, L., Holan, V., Liu, H., Fu, X., Han, W., Crocker, S. J., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), 1327-1333. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-074997>
- Suk, K. T., Yoon, J. -H., Kim, M. Y., Kim, C. W., Kim, J. K., Park, H., Hwang, S. G., Kim, D. J., Lee, B. S., Lee, S. H., Kim, H. S., Jang, J. Y., Lee, C. -H., Kim, B. S., Jang, Y. O., Cho, M. Y., Jung, E. S., Kim, Y. M., Bae, S. H., et al. (2016). Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology*, 64(6), 2185-2197. <https://doi.org/10.1002/hep.28693>
- Sung, P., Chiang, H., Wallace, C., G., Yang, C., Chen, Y., Chen, K., Chen, C., Shao, P., Chen, Y., Chua, S., Chai, H., Chen, Y., Huang, T., Yip, H. & Lee, M. Exendin-4-assisted adipose derived mesenchymal stem cell therapy protects renal function against co-existing acute kidney ischemia-reperfusion injury and severe sepsis syndrome in rat. *Am J Transl Res*. 2017, 9(7), 3167–3183. ISSN 1943-8141/AJTR0053169.
- Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P., Holan, V., Liu, H., Fu, X., Han, W., Crocker, S. J., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2012). The Role of Mouse Mesenchymal Stem Cells in Differentiation of Naive T-Cells into Anti-Inflammatory Regulatory T-Cell or Proinflammatory Helper T-Cell 17 Population: Clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Stem Cells and Development*, 21(6), 901-910. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0157>
- Šinkorová, Z. & Zárbynická L. (2008). Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda (1. část). *Vojenské zdravotnické listy*, LXXVII (3), 98-103.
- Takahashi, M., Li, T. -S., Suzuki, R., Kobayashi, T., Ito, H., Ikeda, Y., Matsuzaki, M., Hamano, K., Li, F., Wang, L., Li, X., Ma, C., Guo, Y., Mezey, É., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2006). Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury: A phase II study. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(2), H886-H893. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00142.2006>
- Velasco, J., Li, J., DiPietro, L., Stepp, M. A., Sandy, J. D., Plaas, A., Feng, X., Sun, L., Lu, S. -J., Pachter, J. S., Crocker, S. J., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2011). Adamts5 Deletion Blocks Murine Dermal Repair through CD44-mediated Aggrecan Accumulation and Modulation of Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) Signaling: Properties and Clinical Application. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 26016-26027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208694>

- Wang, L., Huang, S., Li, S., Li, M., Shi, J., Bai, W., Wang, Q., Zheng, L., & Liu, Y. (2019). Efficacy and Safety of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy for Rheumatoid Arthritis Patients: A Prospective Phase I/II Study. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 4331-4340. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S225613>
- Wang, M., Yuan, Q., Xie, L., Paul, D., Lazorchak, A. S., Chu, J., Kouris, N. A., Yavanian, G. J., Lu, S. -J., Pachter, J. S., Crocker, S. J., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells International*, 2018(1), 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>
- Wang, X., Kimbrel, E. A., Ijichi, K., Paul, D., Lazorchak, A. S., Chu, J., Kouris, N. A., Yavanian, G. J., Lu, S. -J., Pachter, J. S., Crocker, S. J., Lanza, R., Xu, R. -H., & Yang, L. (2014). Human ESC-Derived MSCs Outperform Bone Marrow MSCs in the Treatment of an EAE Model of Multiple Sclerosis: meta-analysis of randomised controlled trials. *Stem Cell Reports*, 3(1), 115-130. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.04.020>
- Wu, J., Kuang, L., Chen, C., Yang, J., Zeng, W. -N., Li, T., Chen, H., Huang, S., Fu, Z., Li, J., Liu, R., Ni, Z., Chen, L., & Yang, L. (2019). MiR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis: meta-analysis of randomised controlled trials. *Biomaterials*, 206(3), 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.022>
- Wynn, T. A., Vannella, K. M., Luo, C., Cui, W., Kirkpatrick, C. J., van den Beucken, J. J. J. P., Ali, M., Mahmood, A., & Xiong, Y. (2016). Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis: meta-analysis of randomised controlled trials. *Immunity*, 44(3), 450-462. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>
- Yao, Y., Huang, J., Geng, Y., Qian, H., Wang, F., Liu, X., Shang, M., Nie, S., Liu, N., Du, X., Dong, J., Ma, C., Guo, Y., Mezey, É., Karussis, D., Villoslada, P., Saiz, A., & Friede, T. (2015). Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells Revealed by Single Cell Gene Profiling in Infarcted Murine Hearts: A phase II study. *PLOS ONE*, 10(6), 42-49. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129164>
- Yuan, L., Sakamoto, N., Song, G., & Sato, M. (2012). Migration of Human Mesenchymal Stem Cells Under Low Shear Stress Mediated by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Stem Cells and Development*, 21(13), 2520-2530. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0010>
- Zhang, B., Luo, Q., Chen, Z., Sun, J., Xu, B., Ju, Y., & Song, G. (2015). Cyclic mechanical stretching promotes migration but inhibits invasion of rat bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*, 14(2), 155-164. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.01.001>
- Zhang, J., Rong, Y., Luo, C., Cui, W., Kirkpatrick, C. J., van den Beucken, J. J. J. P., Ali, M., Mahmood, A., & Xiong, Y. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization: meta-analysis of randomised controlled trials. *Aging*, 12(24), 25138-25152. <https://doi.org/10.18632/aging.104110>
- Zou, K., Wong, J., Abdullah, N., Chen, X., Smith, T., Doherty, M., & Zhang, W. (2016). Examination of overall treatment effect and the proportion attributable to contextual effect in osteoarthritis: meta-analysis of randomised controlled trials. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(11), 1964-1970. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208387>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC	allofykocyanin
CD	cluster of differentiation
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DM1T	diabetes mellitus 1. typu
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EV	extracelulární vezikula
FBS	fetální bovinní sérum
FCM	průtoková cytometrie
FITC	fluorescein isothiokyanát
FSC	přímý rozptyl (forward scatter)
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease)
HGF	hepatocytární růstový faktor
HRP	křenová peroxidasa (horseradish peroxidase)
IDO	indoleamin-2, 3 – dioxygenasa
IFN	interferon
IL	interleukin
ISCT	Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (The International Society for Cellular Therapy)
KM	kondiciované médium
LPS	lipopolysacharid
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MSCs	mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
NHDF	normální lidské dermální fibroblasty (Normal Human Dermal Fibroblasts)
NK	natural killers
PBS	fosfátový pufr
PDGF	destičkový růstový faktor
PE	phycoerythrin
PGE	prostaglandin
PMA	forbol 12-myristát 13-acetát (phorbol 12-myristate 13-acetate)

RS	roztroušená skleróza
SSC	boční rozptyl (side scatter)
Stat5	převodník signálu a aktivátor transkripce 5
SVF	stromální vaskulární frakce
TGF	transformující růstový faktor
Th	pomocný T – lymfocyt
TNF	faktor nádorové nekrózy
Treg	regulační T-lymfocyt
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor