

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie



Bc. Nicole Matějčková

**Imunomodulační vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk
pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou a zdravých dárců**

Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells from patients
with amyotrophic lateral sclerosis and healthy donors

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Eliška Javorková, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

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

V Praze, 11. 8. 2016

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Mgr. Elišce Javorkové, Ph.D. za věnovaný čas a odborné vedení při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za ochotu a všestrannou pomoc. Mé poděkování patří také RNDr. Aleně Zajícové, CSc. za pomoc s metodou ELISA a ostatním kolegům z Oddělení transplantační imunologie za cenné rady a přátelské přijetí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému partnerovi a rodině za podporu a trpělivost při psaní této práce.

Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) mají multipotentní diferenciací potenciál a mohou regulovat reaktivitu imunitního systému. Nejčastěji jsou izolovány a kultivovány z kostní dřeně, tukové tkáně či z pupečníku. Díky kombinaci imunomodulačních a regeneračních vlastností představují MSC možnou alternativu pro využití v léčbě některých závažných onemocnění včetně amyotrofické laterální sklerózy (ALS). Cílem této práce je srovnání MSC od pacientů s ALS a zdravých dárců z hlediska fenotypových, proliferačních a především imunomodulačních vlastností. Posouzení případného vlivu onemocnění na vlastnosti MSC je důležité pro jejich autologní využití v klinických studiích. V této práci byly testovány MSC izolované z kostní dřeně 14 pacientů s ALS a v kontrolní skupině 15 pacientů podstupujících převážně ortopedické operace. V pokusech byly rovněž použity MSC stimulované po dobu 24 hodin prozánětlivými cytokiny, které působí při rozvoji ALS. Buňky byly porovnávány z hlediska fenotypu, schopnosti diferenciaci v adipocyty a osteoblasty, metabolické aktivity, exprese genů pro vybrané imunomodulační molekuly a schopnosti inhibice proliferace lymfocytů. Další experimenty byly zaměřeny na hodnocení imunomodulačních schopností MSC, přičemž byl pomocí průtokové cytometrie, real-time PCR a ELISA sledován jejich vliv na mononukleární buňky periferní krve stimulované lipopolysacharidem nebo fytohemaglutininem. MSC z ALS i kontrolní skupiny vykazovaly standardní fenotyp, metabolickou aktivitu i schopnost diferenciaci. MSC z ALS skupiny reagovaly odlišně na působení prozánětlivých cytokinů a v porovnání s kontrolní skupinou produkovaly méně růstového faktoru hepatocytů, vykazovaly nižší schopnost potlačovat aktivaci cytotoxických T lymfocytů a zvyšovat procento regulačních T lymfocytů. Naproti tomu více potlačovaly produkci faktoru nekrotizujícího nádory- α a exprimovaly vyšší hladiny genu pro interleukin-6 ve srovnání s kontrolní skupinou.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, imunomodulace, neurodegenerativní onemocnění, amyotrofická laterální skleróza, autologní buněčná terapie, zánět nervové tkáně

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) possess a multilineage differentiation potential and have the ability to regulate reactivity of the immune system. They are usually isolated and expanded from the bone marrow, adipose tissue or umbilical cord. MSC represent promising cell population for the treatment of some severe diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), due to the combination of regenerative and immunomodulatory properties. The aim of this study is to compare MSC from ALS patients and healthy donors in their phenotype, proliferative activity and mainly their immunomodulatory properties. The assessment of impact of the disease on the properties of MSC is important for their autologous use in clinical trials. In this study we used MSC isolated from bone marrow of 14 ALS patients and 15 patients undergoing mostly orthopedic surgery as control group. We also used MSC stimulated for 24 hours by proinflammatory cytokines. Cells were compared in terms of immunophenotype, differentiation in adipocytes and osteoblasts, metabolic activity, expression of selected genes for immunomodulatory molecules and for inhibition of lymphocyte proliferation. Further experiments were focused on evaluation of immunomodulatory properties of MSC. The effect of MSC on peripheral blood mononuclear cells stimulated with either phytohemagglutinin or lipopolysaccharide was assessed by flow cytometry, real-time PCR and ELISA. MSC from ALS and control group showed standard phenotype, metabolic activity and differentiation potential. MSC from ALS and control group also comparably inhibited lymphocyte proliferation and activation in a dose-dependent manner. MSC in ALS group responded differently to stimulation by proinflammatory cytokines and produced less hepatocyte growth factor, had lower ability to inhibit cytotoxic T lymphocyte activation and increase percentage of regulatory T lymphocytes. On the other hand they exerted higher ability to inhibit production of tumor necrosis factor- α and expressed higher levels of gene for interleukin 6 in comparison with MSC in control group.

Key words: mesenchymal stem cells, immunomodulation, neurodegenerative diseases, amyotrophic lateral sclerosis, autologous cell therapy, neuroinflammation

Obsah

Seznam zkratk.....	1
1. Úvod	3
2. Cíle práce.....	4
Literární přehled	5
3. Mezenchymální kmenové buňky.....	5
3.1. Imunomodulační vlastnosti MSC.....	5
3.2. Migrace MSC do místa poškození	14
3.3. Terapeutické využití MSC	15
4. Amyotrofická laterální skleróza	17
4.1. Imunitní systém v patogenezi ALS	17
4.2. Buňky CNS v patogenezi ALS.....	21
4.3. Léčba ALS.....	22
4.4. Léčba ALS pomocí kmenových buněk	23
Materiál a Metody	27
5. Materiál.....	27
5.1. Používané buňky	27
5.2. Roztoky a média.....	27
5.3. Technické vybavení.....	28
5.4. Použitý software	29
6. Metody.....	29
6.1. Izolace a kultivace MSC	29
6.2. Izolace PBMC	30
6.3. Charakterizace MSC	31
6.4. Funkční testy MSC.....	34
6.5. Statistická analýza	41
Výsledky.....	42

7. Charakterizace MSC.....	42
7.1. Fenotyp MSC	42
7.2. Diferenciace MSC	44
7.3. Metabolická aktivita MSC	45
7.4. Produkce a exprese genů pro imunomodulační molekuly MSC	46
8. Funkční testy MSC	48
8.1. Inhibice proliferace PBMC	48
8.2. Vliv MSC na buňky přirozené imunity	49
8.3. Stanovení vlivu MSC na aktivaci T lymfocytů	50
8.4. Vliv MSC na subpopulace CD4 ⁺ T lymfocytů.....	52
Diskuse	60
Závěr.....	66
Seznam použité literatury	67

Seznam zkratek

ADPC	adiponektin (<i>adiponectin</i>)
ALS	amyotrofická laterální skleróza
APC	buňky prezentující antigen (<i>antigen presenting cells</i>)
CD	diferenciační skupina (<i>cluster of differentiation</i>)
CNS	centrální nervový systém
COX	cyklooxygenáza
CXCL	chemokinový ligand
CXCR	chemokinový receptor
DC	dendritické buňky (<i>dendritic cells</i>)
DMSO	dimethyl sulfoxid
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FOXP3	<i>forkhead box p3</i>
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
HGF	růstový faktor hepatocytů (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HO	hemoxygenáza
IDO	indolamin-2,3-dioxygenáza
IFN	interferon
IL	interleukin
LPS	lipopolysacharid
mAb	monoklonální protilátka (<i>monoclonal antibody</i>)
mDC	myeloidní dendritické buňky (<i>myeloid dendritic cells</i>)
MSC	mezenchymální kmenové buňky (<i>mesenchymal stem cells</i>)
NK	přirození zabíječi (<i>natural killers</i>)

OPN	osteopontin
PBMC	mononukleární buňky z periferní krve (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky (<i>plasmacytoid dendritic cells</i>)
PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i>
PE	<i>phycoerythrin</i>
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PHA	fytohemagglutinin (<i>phytohemagglutinin</i>)
PPARG	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
ROR γ t	<i>retinoid-related orphan receptor γt</i>
SD	směrodatná odchylka (<i>standard deviation</i>)
SDF	faktor stromálních buněk (<i>stromal cell-derived factor</i>)
SOD	superoxid dismutáza
T-BET	<i>T-box transcription factor TBX21</i>
Tc	cytotoxické T lymfocyty
TGF	transformující růstový faktor (<i>transforming growth factor</i>)
Th	pomocné T lymfocyty (<i>helper T cells</i>)
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	faktor nekrotizující nádory (<i>tumor necrosis factor</i>)
Treg	regulační T lymfocyty
TSG-6	<i>TNF-α stimulated gene 6 protein</i>
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (MSC, *mesenchymal stem cells*) jsou multipotentní buňky, nacházející se téměř ve všech tkáních organismu. Nejčastěji jsou MSC získávány z kostní dřeně, tukové tkáně či pupečníku. MSC mohou diferencovat v mnoha buněčných typů a produkují řadu růstových faktorů, přispívajících k obnově tkání a udržování jejich homeostázy. MSC mohou také ovlivňovat průběh imunitních reakcí produkcí různých imunomodulačních faktorů, expresí mnoha povrchových molekul účastnících se imunitních interakcí a také díky jejich schopnosti migrovat do místa poškození. Svým působením mohou regulovat aktivaci a proliferaci přirozených i adaptivních složek imunity a zpravidla navozují tolerogenní a protizánětlivé prostředí. Vzhledem k jejich imunomodulačnímu a regenerativnímu působení se v současné době uvažuje o klinickém využití MSC v regenerativní medicíně, v terapii některých autoimunitních onemocnění nebo pro potlačení nežádoucích reakcí při transplantacích.

Jedním z možných terapeutických využití MSC je léčba amyotrofické laterální sklerózy (ALS), závažného, rychle progredujícího neurodegenerativního onemocnění, při kterém dochází k selektivnímu odumírání motoneuronů. Progresivní ztráta pohyblivosti a rozvoj bulbárního syndromu vede během 2-5 let k úmrtí pacientů obvykle v důsledku respiračního selhání. Využití MSC v léčbě pacientů s ALS představuje nástroj pro možné zpomalení progresu onemocnění a zmírnění jejich příznaků. V současné době probíhá ve světě několik desítek klinických studií testujících využití kmenových buněk v terapii tohoto doposud nevléčitelného onemocnění. U některých imunologicky podmíněných onemocnění jako je systémová sklerodermie nebo roztroušená skleróza byl popsán vliv onemocnění na vlastnosti MSC. V případě ALS, na jejímž rozvoji se také podílí imunopatologické reakce, je tedy otázkou, zda jsou MSC těchto pacientů ovlivněny či nikoliv. Posouzení možného vlivu ALS na vlastnosti MSC je klíčové pro jejich autologní použití v terapii.

2. Cíle práce

Za účelem zpomalení progresu ALS se v klinických studiích testuje podání MSC, které jsou ve většině případů autologního původu. U některých imunologicky podmíněných onemocnění, jako diabetes či roztroušená skleróza, byl popsán vliv onemocnění na vlastnosti MSC. Podobně jsou zapojeny imunitní mechanismy i v patogenezi ALS a posouzení vlivu onemocnění na imunomodulační vlastnosti MSC může tudíž přinést cenné informace pro jejich využití v terapii.

Protože exprese některých imunomodulačních molekul MSC je inducibilní a lze ji navodit působením některých prozánětlivých cytokinů, bylo jedním z cílů této práce zjistit, jak vybrané prozánětlivé cytokiny - interferon- γ (IFN- γ), faktor nekrotizující nádory- α (TNF- α , *tumor necrosis factor*) a interleukin 6 (IL-6), které jsou klíčové při imunopatologických reakcích u pacientů s ALS, ovlivní imunomodulační vlastnosti MSC.

Dalším cílem bylo charakterizovat MSC od pacientů s ALS a zdravých dárců z hlediska metabolické aktivity, diferenciačního potenciálu a exprese genů pro vybrané imunomodulační molekuly.

Hlavním cílem bylo porovnat imunomodulační schopnosti MSC od pacientů s ALS a zdravých dárců z hlediska působení na buňky přirozené imunity a dále působení na buňky adaptivní imunity, včetně aktivace cytotoxických T (Tc) lymfocytů a pomocných T (Th, *helper T cells*) lymfocytů a vlivu na populace Th1, Th2, Th17 a regulačních T (Treg) lymfocytů.

Literární přehled

3. Mezenchymální kmenové buňky

MSC patří mezi multipotentní kmenové buňky, které můžeme izolovat z celé řady tkání organismu. Nejčastěji se získávají z kostní dřeně, tukové tkáně či z pupečníku. MSC mohou za určitých podmínek diferencovat v buňky tkání mezenchymálního původu, jako je tuková tkáň, kost, chrupavka, šlacha nebo hladká svalovina (Jacobs et al. 2013). Dále byla prokázána i schopnost transdiferenciace v buňky pocházející z jiných zárodečných listů, jako například neurony (Jeong et al. 2013; Joe et al. 2015), epiteliální buňky (Wang et al. 2014; Gao et al. 2015), hepatocyty (Zheng et al. 2015) či buňky produkující insulin (Jafarian et al. 2014) a mnoho dalších.

MSC nemají jedinečný identifikační znak, proto jsou charakterizovány na základě exprese několika pozitivních a negativních znaků a dalších klíčových vlastností. Podle Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii (Dominici et al. 2006) musí MSC splňovat především tři základní parametry:

- Adherence k platu (za standartních kultivačních podmínek)
- Expese specifických povrchových znaků (≥ 95 % buněčné populace musí exprimovat CD (*cluster of differentiation*) 105, CD73 a CD90 a zároveň ≤ 2 % buněčné populace může exprimovat CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79 α nebo CD19 a lidský leukocytární antigen (HLA, *human leukocyte antigen*) II. třídy
- Multipotentní diferenciační potenciál (schopnost diferencovat v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty *in vitro*)

3.1. Imunomodulační vlastnosti MSC

Důležitou vlastností MSC je jejich schopnost tlumit zánětlivou odpověď a ovlivňovat reaktivitu buněk imunitního systému. Tyto buňky mají schopnost ovlivňovat reakce přirozených i adaptivních složek imunity. Na imunitní systém mohou působit jednak produkcí celé řady imunoregulačních molekul, cytokinů, chemokinů či růstových faktorů, ale také prostřednictvím přímého kontaktu mezi buňkami (English 2012).

MSC přímým mezibuněčným kontaktem například indukují apoptózu T lymfocytů vazbou PD-L1 (*programmed death ligand 1*) na PD1 molekulu lymfocytů (Yan et al.

2014). Prostřednictvím kontaktu mezi buňkami také snižují expresi HLA II. třídy a některých kostimulačních molekul a produkci IL-12 u dendritických buněk (DC, *dendritic cells*) (Aggarwal et Pittenger 2005).

Mezi hlavní imunomodulační molekuly exprimované MSC patří IL-6, cyklooxygenáza-2 (COX-2) produkující prostaglandin E₂ (PGE₂), růstový faktor hepatocytů (HGF, *hepatocyte growth factor*), transformující růstový faktor-β (TGF, *transforming growth factor*), indolamin-2,3-dioxygenáza (IDO), hemoxygenáza-1 (HO-1) nebo TNF-α stimulovaný gen-6 protein (TSG-6). Některé imunomodulační molekuly jsou produkovány MSC konstitutivně, jiné pouze po stimulaci prozánětlivými faktory – nejčastěji IFN-γ, TNF-α nebo IL-1β (Krampera et al. 2006).

Krampera et al. (2006) ve své studii pozorovali vliv IFN-γ produkovaného aktivovanými Th lymfocyty a přirozenými zabíječi (NK, *natural killers*) na imunosupresivní účinky MSC. Ukázali, že pod vlivem IFN-γ dochází k účinnějšímu potlačení proliferace různých populací Th lymfocytů, NK buněk i Tc lymfocytů a že tyto účinky nejsou závislé na přímém kontaktu mezi buňkami. Dále zjistili, že supresivní účinky MSC *in vitro* bylo možné vyvolat pouze při přidání MSC do leukocytární kultury již v prvních dnech kultivace, což ukazuje na důležitost interakce mezi MSC a cílovými buňkami již v časných fázích imunitní reakce. Mediátorem suprese proliferace lymfocytů byla v tomto případě zřejmě IDO, jejíž produkci lze indukovat u MSC působením IFN-γ, a která metabolizuje tryptofan, což je esenciální aminokyselina pro proliferaci lymfocytů.

Imunomodulační vlastnosti MSC mohou být také významně ovlivněny stimulací přes různé povrchové receptory. MSC exprimují povrchové i intracelulární PRRs (*pattern recognition receptors*), přičemž signální kaskády spouštěné přes tyto receptory jsou rozhodující pro povahu imunomodulačního působení MSC. Bylo popsáno, že stimulace přes TLR4 (TLR, *Toll like receptor*) vyvolává u MSC prozánětlivý fenotyp, produkci IL-6 a IL-8 a naopak stimulace přes TLR3 navozuje u MSC protizánětlivý fenotyp a expresi IDO, IL-4 a COX-2 (Waterman et al. 2010).

Na základě schopnosti MSC reagovat na prostředí, ve kterém se nacházejí, byl navržen model polarizace MSC analogický k M1/M2 makrofágům. Pro terapeutické využití MSC je nutné tuto skutečnost zvážit při aplikaci a přizpůsobit načasování buněčné terapie tak, aby došlo k navození protizánětlivého fenotypu MSC (Waterman et al. 2010).

3.1.1. Imunogenicita MSC

MSC vykazují nízkou imunogenicitu při alogenním použití nezávisle na shodě v HLA. MSC exprimují střední hodnoty HLA I. třídy a v klidovém stavu neexprimují HLA II. třídy. Při stimulaci pomocí nízké koncentrace IFN- γ dochází k aktivaci MSC, vedoucí ke zvýšení exprese HLA I. třídy, k navození exprese HLA II. třídy a adhezivní molekuly ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), čímž se z MSC stávají neprofesionální antigen prezentující buňky (APC, *antigen presenting cells*). MSC nevyvolávají imunitní reakci ani v aktivovaném stavu, což může být způsobeno absencí exprese kostimulačních molekul CD80, CD86 či CD40 a některých adhezivních molekul, například LFA-3 (*lymphocyte function-associated antigen 3*). Z tohoto důvodu nefungují MSC jako účinné APC ani po stimulaci prozánětlivými faktory a spíše navozují tolerogenní prostředí (Chan et al. 2006; Tse et al. 2003).

MSC dále vyvolávají anergii u CD4⁺ T lymfocytů, v jejímž navození je významná signalizace přes HLA II. třídy a absence kostimulačních signálů u MSC. Supresivní účinky MSC na leukocyty jsou z větší části zprostředkovány produkovanými molekulami, ale účinnost imunomodulace se zvyšuje při přímém mezibuněčném kontaktu. Je tedy pravděpodobné, že je pro maximální supresivní efekt MSC nezbytný i mezibuněčný kontakt, související s expresí řady povrchových molekul, například HLA II. třídy a současnou absencí kostimulačních molekul (Batten et al. 2006).

3.1.2. Molekuly účastnící se imunomodulačního působení MSC

MSC produkují některé imunomodulační molekuly konstitutivně, u jiných je nutno jejich produkci indukovat působením cytokinů, zejména IFN- γ , TNF- α nebo IL-1 β (Krampera et al. 2006; Liu et al. 2012). Působení MSC úzce souvisí s prostředím, ve kterém se nacházejí a nemusí být vždy striktně protizánětlivé nebo tolerogenní.

Indolamin-2,3-dioxygenáza (IDO)

IDO je enzym s hemovým centrem, který metabolizuje tryptofan na N-formylkinurenin. Pro proliferaci lymfocytů je nezbytné dostatečné množství tryptofanu. Působením IDO může dojít k vyčerpání tryptofanu z prostředí a k inhibici proliferace lymfocytů, což může mít zásadní vliv na průběh imunitní reakce. Produkce IDO u MSC je inducibilní a lze ji navodit například působením IFN- γ (François et al. 2012).

Působení IDO ovlivňuje celou řadu imunitních mechanismů. Vedle potlačení proliferace lymfocytů podporuje vývoj alternativních M2 makrofágů s protizánětlivým

fenotypem a Treg lymfocytů ovlivněním DC (François et al. 2012), potlačuje diferenciaci Th17 lymfocytů (Tatara et al. 2011) a inhibuje proliferaci NK buněk, pro které je tryptofan také esenciální aminokyselinou. Současně s TGF- β a PGE₂ inhibuje aktivaci CD8⁺ T lymfocytů (Li et al. 2014).

Prostaglandin E2 (PGE₂)

PGE₂ je metabolit kyseliny arachidonové, který vzniká aktivitou enzymů COX-1, COX-2 a prostaglandin syntázy. Tento enzym je syntetizován MSC konstitutivně a jeho produkci lze zvýšit stimulací pomocí TNF- α nebo IFN- γ (Aggarwal et Pittenger 2005). PGE₂ potlačuje proliferaci T lymfocytů a NK buněk, přičemž inhibuje diferenciaci myeloidních DC (mDC) (Spaggiari et al. 2009), podílí se také na supresi Th17 lymfocytů (Tatara et al. 2011) a ovlivňuje i celou řadu dalších imunitních reakcí.

Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 je považován za jeden z hlavních prozánětlivých cytokinů. Jeho působení však může být do značné míry pleiotropní, může spouštět odlišné signalizační dráhy a ovlivňovat řadu nejen imunitních procesů. V kombinaci s IL-1 β a TNF- α spouští sekreci proteinů akutní fáze, indukuje expresi adhezivních molekul, aktivaci neutrofilů a makrofágů, což vede k rozvoji zánětu. Ve spojení s IL-4 naopak přispívá k rozvoji Th2 odpovědi (Scheller et al. 2011). IL-6 je také důležitý pro stimulaci B lymfocytů a následnou produkci protilátek. V regulaci vývoje Th17 lymfocytů má IL-6 duální roli. V kombinaci s TGF- β indukuje vývoj Th17 buněk (Bettelli et al. 2006), zároveň ale samotný podporuje vývoj CD8⁺Foxp3⁺ (*forkhead box p3*) buněk, které vývoj Th17 buněk blokují (Nakagawa et al. 2009). Na jeho funkci v protizánětlivé imunitní odpovědi ukazují *in vivo* testy na myším modelu s deficitem IL-6, kde byla zjištěna zvýšená tvorba prozánětlivých cytokinů (Xing et al. 1998).

MSC produkují IL-6 konstitutivně, jeho produkci lze ale zvýšit ovlivněním prozánětlivými cytokiny (Romieu-Mourez et al. 2009). IL-6 působí na MSC také autokrinně a indukuje u nich produkci IL-10. MSC mohou inhibovat diferenciaci monocytů do DC buď přímo sekrecí IL-6 nebo zprostředkovaně autokrinně stimulovanou produkcí IL-10. Dále mohou MSC produkcí IL-10 podporovat vývoj Treg lymfocytů, které dále přispívají k indukci tolerogenních DC a potlačení schopnosti DC prezentovat antigen (Djouad et al. 2007).

Transformující růstový faktor beta (TGF- β)

TGF- β je součástí superrodiny dimerních polypeptidových růstových faktorů, přičemž u savců rozlišujeme 3 izoformy, které mají různé funkce v závislosti na cílovém buněčném typu. TGF- β je považován za jeden z nejdůležitějších konstitutivně produkovaných imunomodulačních cytokinů u MSC. Má pleiotropní účinky nejen na buňky imunitního systému zahrnující regulaci proliferace, diferenciaci, migraci, apoptózy, hojení či angiogeneze (Li et al. 2006).

V imunitním systému ovlivňuje rozvoj zánětlivé odpovědi a navození a udržování tolerance ovlivněním proliferace, diferenciaci, aktivace a přežívání leukocytů. Jedním z mechanismů antiproliferativních účinků TGF- β je blokáda produkce IL-2, hlavního růstového faktoru T lymfocytů (McKarns et al. 2004). Mezi jeho další funkce patří podpora vývoje Treg lymfocytů a utlumení reaktivity NK buněk, B lymfocytů, DC a makrofágů (Yoshimura et Muto 2011).

TGF- β je konstitutivně sekretován MSC a je zřejmě jednou z hlavních efektorových molekul zapojených v jejich imunomodulačním působení MSC. V práci Di Nicola et al. (2002) byla popsána role TGF- β produkovaného MSC v inhibici proliferace T lymfocytů, která byla potlačena přidáním anti-TGF- β protilátky.

Růstový faktor hepatocytů (HGF)

HGF ovlivňuje růst a migraci zejména endoteliálních a epiteliálních buněk a dále angiogenezi a působí také na celou řadu buněk imunitního systému. HGF je MSC produkován konstitutivně a jeho produkci lze u MSC navýšit působením prozánětlivého prostředí. Způsobuje inhibici proliferace anti-CD3/CD28 stimulovaných T lymfocytů. Pro inhibici lymfocytů stimulovaných fytohemaglutininem (PHA, *phytohemagglutinin*) je nezbytné působení HGF na monocyty přes receptor c-Met. Signalizace přes c-Met navozuje u monocytů imunomodulační fenotyp, vyznačující se vysokou produkcí IL-10. Vlivem IL-10 dochází u CD4⁺ lymfocytů stimulovaných PHA ke snížení produkce IFN- γ , posílení produkce IL-4 a k posunu rovnováhy od Th1 k Th2 typu odpovědi (Chen et al. 2014).

TNF- α stimulovaný gen-6 protein (TSG-6)

TSG-6 je glykoprotein s protizánětlivými účinky. Je konstitutivně exprimován MSC, ale jeho produkci lze významně zvýšit působením prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 (Wisniewski et al. 1997). Na rozdíl od většiny výše zmíněných molekul může působit na delší vzdálenosti bez nutnosti migrace MSC do místa poškození.

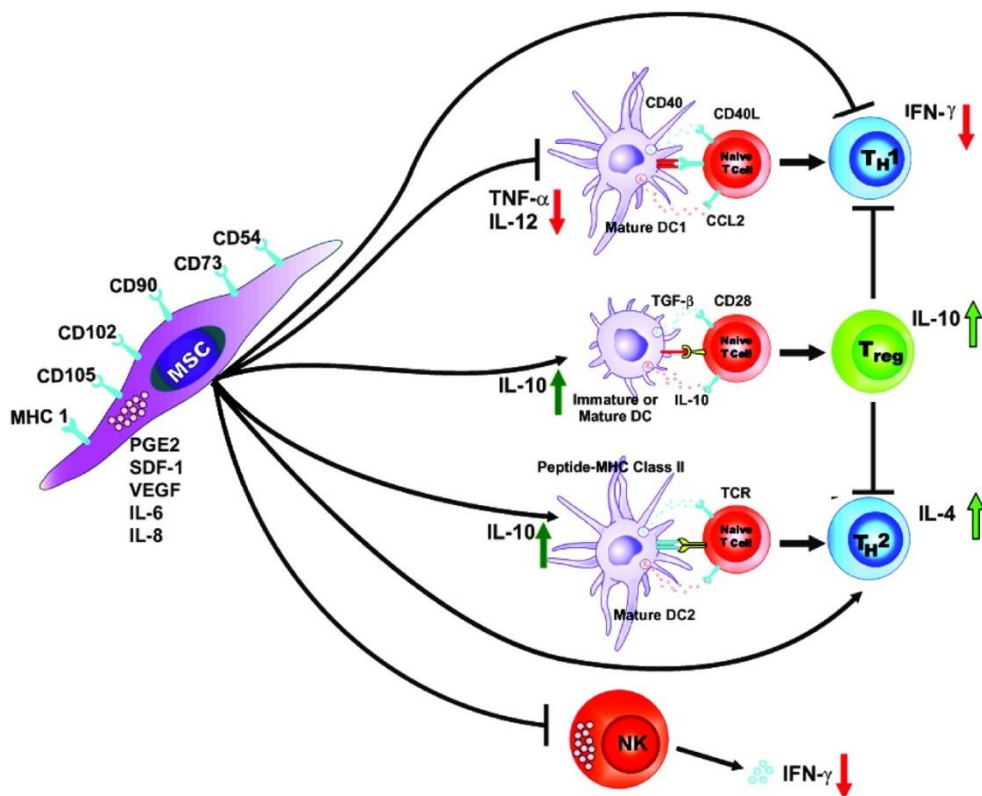
Jedním z mechanismů jeho působení je inhibice vycestování neutrofilů do místa zánětu a eliminace poškození v důsledku jejich aktivity. U makrofágů blokuje vazbou na CD44 dráhu TLR2/NF- κ B, a tím i produkci prozánětlivých mediátorů, ovlivňujících uvolňování chemotaktických molekul okolními buňkami. To vede ke snížení infiltrace neutrofilů a cirkulujících makrofágů do místa poškození a k inhibici zánětu (Choi et al. 2011).

Pravděpodobně právě v důsledku systémového působení TSG-6 byl pozorován protizánětlivý efekt systémově aplikovaných MSC u modelů infarktu myokardu (Lee et al. 2014), poškození rohovky (J. Y. Oh et al. 2010), otřesu mozku (Watanabe et al. 2011), diabetu I. typu (Kota et al. 2013) a to i přes to, že MSC nebyly přítomné v místě poškození, ale byly nalezeny pouze v plicích nebo dalších orgánech.

3.1.3. Vliv MSC na buňky imunitního systému

MSC mohou svými imunomodulačními vlastnostmi ovlivňovat téměř všechny složky přirozené i adaptivní imunity (Obrázek 1). Produkují celou řadu cytokinů, růstových faktorů a dalších molekul a exprimují mnoho povrchových receptorů působících nejen na buňky imunitního systému. Jako reakci na okolní prostředí MSC zpravidla ovlivňují několik složek imunity zároveň. MSC potlačují imunitní reakce přímou interakcí i zprostředkovaně ovlivněním profesionálních APC (Batten et al. 2006).

MSC exprimují celou řadu povrchových receptorů, jejichž prostřednictvím získávají komplexní informace o okolním prostředí. Na základě signálů z těchto receptorů, zejména TLR, dochází k jejich polarizaci směrem k prozánětlivému nebo protizánětlivému fenotypu. MSC mohou působit i na delší vzdálenosti, ale nejvýznamnějších imunomodulačních účinků bylo dosaženo při kombinaci přímého kontaktu s cílovými buňkami a působení produkovaných faktorů (English 2012).



Obrázek 1: Mechanismy působení MSC na buňky imunitního systému. MSC mohou interagovat s buňkami přirozené (DC, NK buňky) i adaptivní (T lymfocyty) imunity. MSC inhibují sekreci TNF- α a podporují produkci IL-10, což může ovlivňovat zrání a funkční vlastnosti DC a vést k posunu imunitní odpovědi protizánětlivým směrem. V zánětlivém prostředí MSC inhibují produkci IFN- γ Th1 a NK buňkami a podporují produkci IL-4 Th2 buňkami, což vede k posunu Th1/Th2 rovnováhy. Je pravděpodobné, že na imunomodulačním působení MSC se podílí mezibuněčný kontakt i produkce solubilních faktorů. CCL, chemokinový ligand; MHC, hlavní histokompatibilní komplex; SDF, faktor odvozený od stromálních buněk, TCR, T-buněčný receptor. Převzato z Aggarwal et Pittenger (2005) a upraveno.

T lymfocyty

T lymfocyty jsou klíčovou složkou adaptivní imunity a jejich abnormální aktivace se podílí na patogenezi celé řady onemocnění, přičemž její regulace může vést ke zmírnění či potlačení projevů takovýchto onemocnění. U naivních lidských CD4⁺ T lymfocytů mohou MSC indukovat anergii pomocí solubilních inhibitorů nebo po interakci přes HLA II. třídy s absencí kostimulačního signálu (Batten et al. 2006; Duffy et al. 2011).

U MSC byly *in vitro* prokázány schopnosti tlumit aktivaci a proliferaci lymfocytů a také posouvat rovnováhu mezi populacemi CD4⁺ T lymfocytů ve prospěch Th2 odpovědi a Treg lymfocytů na úkor Th1 a Th17 lymfocytů. Supresivní působení MSC může být přímé, či nepřímo zprostředkované ovlivněním DC a produkce cytokinů, které

jsou pro polarizaci T buněk klíčové. MSC mají *in vitro* schopnost potlačovat proliferaci T lymfocytů, přičemž je tento inhibiční efekt zprostředkován kombinací produkce TGF- β a HGF a přímého mezibuněčného kontaktu. Potlačení proliferace není důsledkem apoptózy T lymfocytů a vliv MSC na T lymfocyty je reverzibilní (Di Nicola et al. 2002).

Existuje řada studií, které prokázaly, že se Th1 a Th17 lymfocyty často účastní patogeneze v neurodegenerativních onemocněních, u kterých dochází k zánětlivému poškození nervové tkáně (Gharibi et al. 2015). Aktivované T lymfocyty mohou procházet přes hematoencefalickou bariéru a působit přímo na buňky nervového systému. V závislosti na typu T lymfocytů se u neurodegenerativních onemocnění mohou podílet jak na neuroprotektivní, tak neurotoxické reakci v centrálním nervovém systému (CNS). Produkce IL-10 Treg a Th2 buňkami je zásadní pro tlumení zánětlivé reakce a navození tolerance v CNS, což chrání nervové buňky před odumíráním (Xin et al. 2011). Právě vliv MSC na aktivované periferní leukocyty i mikroglie v CNS by mohl mít pozitivní vliv při léčbě neurodegenerativních onemocnění.

Th1/Th2 lymfocyty

Hlavním cytokinem determinujícím vývoj Th1 lymfocytů je IL-12, produkováný zejména makrofágy a DC. Th1 buňky se vyznačují expresí transkripčního faktoru T-BET (*T-box transcription factor TBX21*) produkují především IFN- γ , který aktivuje makrofágy, které sekrecí prozánětlivých cytokinů IL-1, TNF- α a dalších podporují rozvoj lokálního zánětu. Th2 lymfocyty se vyvíjí pod vlivem IL-4 produkováného žírnými buňkami a bazofily a vyznačují se expresí transkripčního faktoru GATA-3 (*GATA binding protein 3*). Produkci IL-4 a IL-10 aktivují Th2 lymfocyty maturaci B lymfocytů a podporují protizánětlivý typ imunitní odpovědi.

Přítomnost MSC v kultuře T lymfocytů inhibuje produkci IFN- γ a zvyšuje hladiny IL-4. Interakcí s T lymfocyty posouvají MSC rovnováhu směrem k Th2 typu odpovědi a u naivních T lymfocytů podporují vývoj směrem k Th2 a Treg lymfocytům (Aggarwal et Pittenger 2005).

Th17/Treg lymfocyty

Pro Th17 lymfocyty je charakteristická produkce IL-17 a dalších prozánětlivých cytokinů. Vyznačují se expresí transkripčního faktoru ROR γ t (*retinoid-related orphan receptor γ t*). Jejich vývoj z naivních CD4⁺ T lymfocytů je determinován přítomností TGF- β a IL-6. Th17 lymfocyty v organismu regulují zánět a zajišťují obranu proti

některým extracelulárním patogenům (Wilson et al. 2007). Byla popsána i jejich role v patogenezi řady onemocnění, jako je roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, lupénka či střevní zánětlivá onemocnění (Ghannam et al. 2010). Treg lymfocyty jsou důležité pro zachování tolerance vůči vlastním tkáním a podílí se na udržení periferní tolerance. Jejich vývoj je determinován přítomností TGF- β a vyznačují se expresí transkripčního faktoru FOXP3 (Wahl et al. 2004).

MSC inhibují přímým kontaktem a produkcí TGF- β a PGE₂ vývoj Th17 lymfocytů a naopak podporují vývoj Treg lymfocytů. U Th17 lymfocytů potlačují produkci IL-17, snižují expresi transkripčního faktoru ROR γ t a naopak posilují expresi transkripčního faktoru FOXP3 a navozují regulační fenotyp T lymfocytů (Ghannam et al. 2010; Svobodova et al. 2012).

Cytotoxické T lymfocyty

CD8⁺ Tc lymfocyty rozeznávají buňky infikované intracelulárními parazity či nádorově transformované buňky a buněčným kontaktem a sekrecí cytotoxických látek tyto buňky likvidují. Při silné aktivaci cytotoxických mechanismů u Tc lymfocytů může docházet ke značnému poškození okolní tkáně.

Při společné kultivaci MSC a nestimulovaných mononukleárních buněk periferní krve (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) dochází k navození tolerogenního fenotypu Tc lymfocytů snížením exprese CD8, CD28 a CD44 molekul a také potlačením produkce cytotoxických mediátorů. Navození tolerogenního fenotypu je zprostředkováno CD14⁺ monocyty, u kterých MSC působením solubilních faktorů indukují regulační fenotyp, snižují expresi MHC II. třídy, kostimulačních molekul CD80 a CD86 a posilují expresi inhibičních molekul. Tolerogenní Tc lymfocyty zpětně ovlivňují monocyty a podílejí se na udržení tolerogenního fenotypu a také negativně ovlivňují proliferaci lymfocytů (Hof-Nahor et al. 2012).

Makrofágy

V závislosti na způsobu aktivace se makrofágy polarizují do klasického M1 či alternativního M2 fenotypu. M1 makrofágy jsou stimulované přes TLR či IFN- γ , působí prozánětlivě a produkují vysoké hladiny TNF- α a IL-1 β . Naproti tomu M2 makrofágy jsou stimulované IL-4/IL-13 a produkují IL-10, čímž indukují protizánětlivou odpověď (Sica et Mantovani 2012).

MSC podporují alternativní aktivaci makrofágů expresí PGE₂,IDO a TSG-6, což vede k inhibici zánětu, snižování produkce prozánětlivých cytokinů a stimulaci

produkce IL-10 u makrofágů (Chiossone et al. 2016). Podobným způsobem MSC ovlivňují i polarizaci M1/M2 mikroglíí, které plní funkci makrofágů v CNS a navozují u nich neuroprotektivní M2 fenotyp (Zanier et al. 2014).

Dendritické buňky

DC jsou profesionální APC a nejúčinněji stimulují ostatní buňky imunitního systému při zahájení a regulaci antigenně specifické imunitní reakce. MSC potlačují prostřednictvím PGE₂ diferenciaci a zrání mDC a mění rovnováhu mezi mDC a plazmacytoidními DC (pDC). U zralých mDC potlačují MSC produkci TNF- α , naopak u pDC zvyšují produkci IL-10 a posouvají tak polarizaci imunitní reakce k protizánětlivému typu odpovědi (Aggarwal et Pittenger 2005). Dále MSC inhibují expresi některých chemokinových receptorů a HLA II. třídy a tím snižují schopnosti DC migrovat do lymfatických uzlin a prezentovat antigen (Spaggiari et al. 2009).

NK buňky

NK buňky se řadí do přirozené imunity a zajišťují obranu proti virem infikovaným či nádorovým buňkám, které NK buňky likvidují cytotoxickými mechanismy. MSC dokáží potlačovat aktivaci a proliferaci klidových NK buněk a snižovat u nich produkci IFN- γ . Inhibice je způsobena produkcí aktivinu A, který ovlivňuje složky signálních drah aktivace NK buněk STAT4 (*signal transducer and activator of transcription 4*) a nukleární faktor kappa B a snížením množství transkripčního faktoru T-bet, který je hlavním regulátorem produkce IFN- γ u T lymfocytů a NK buněk (Chatterjee et al. 2014).

3.2. Migrace MSC do místa poškození

Schopnost MSC migrovat do místa poškození je důležitá pro jejich efektivní působení na buňky imunitního systému i pro jejich reparativní účinky. Schopnosti MSC migrovat po směru gradientu chemoatraktantů jsou zkoumány *in vitro* i *in vivo*. Na zvířecích modelech je studována schopnost migrace MSC do poškozené tkáně systémovou aplikací značených MSC a sledováním jejich pohybu v organismu pomocí neinvazivních zobrazovacích metod a studiím histologických řezů tkání. Migrace MSC a usídlování ve tkáních je ovlivněno celou řadou faktorů, zejména pak podmínkami a délkou kultivace, věkem dárce, množstvím buněk a způsobem podání (Sohni et Verfaillie 2013).

Mechanismus migrace aplikovaných či rezidentních MSC do tkání nebyl dosud zcela objasněn. Předpokládá se, že princip by mohl být podobný jako u leukocytů, tedy že MSC migrují přes cévní stěnu za pomoci aktivovaných buněk endotelu v kombinaci s mechanismy specifickými pro MSC (Teo et al. 2012). Podle Chamberlain et al. (2011) je první fáze přichycení k endotelu pravděpodobně pasivní a je umožněna zpomalením pohybu MSC v úzkých kapilárách. V důsledku toho může následně dojít ke specifické vazbě přes chemokinové receptory a prostupu MSC přes stěnu endotelu do tkání. Teo et al. (2015) naproti tomu navrhuje model aktivního přichycení MSC na stěnu endotelu v místě zánětu zprostředkovanou neutrofily a krevními destičkami. Specifické přichycení MSC by pak bylo důsledkem sekundární adhezivní interakce.

Při nitrožilním podání MSC dochází k akumulaci těchto buněk v některých orgánech, především v plicích či k nespecifickému uchycení v cévách a do místa poškození se dostává jen malá část z původního množství podaných buněk (Javorkova et al. 2014; Naaldijk et al. 2015). Migraci MSC do cílové tkáně mohou podporovat růstové faktory či prozánětlivé molekuly. Naaldijk et al. (2015) pozorovali zlepšení migračních schopností MSC po ovlivnění TNF- α , IFN- γ , SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) a bFGF (*basic fibroblast growth factor*). Zvýšení pozitivního efektu těchto molekul na migrační schopnost MSC dále pozorovali při hypoxických podmínkách.

Aplikované MSC mají, podobně jako hematopoetické kmenové buňky, schopnost usídlit se v různých orgánech mimo kostní dřeň. Tato schopnost je závislá na celé řadě interakcí, z nichž nejdůležitější je vazba mezi CXCR4 a jeho ligandem SDF-1 (CXCL12), popisovaná i u transplantovaných hematopoetických buněk směřujících do kostní dřeně. V případě poškozené nervové tkáně byla pozorována zvýšená exprese chemokinových ligandů, která vedla k migraci MSC z krevního oběhu, což bylo nezbytné pro účinnou reparaci dané tkáně (Carbajal et al. 2010). V dalších studiích využívajících experimentální modely ischemie či poškození páteře bylo pozorováno uchycení aplikovaných buněk v poškozené tkáni a produkce reparačních i imunomodulačních molekul, které podporovaly proces hojení a potlačovaly probíhající zánět (Wang et al. 2014; Zeng et al. 2015).

3.3. Terapeutické využití MSC

Klinické aplikace MSC byly původně zaměřeny na využití jejich regenerativních a diferenciačních vlastností. Testovalo se například využití MSC u pacientů po poranění

míchy, při léčbě degenerativních onemocnění především pohybového aparátu, infarktu či mozkové mrtvice nebo podání MSC jako podpůrné terapie po úrazech. V současné době se celá řada studií zaměřuje i na využití rozsáhlých imunomodulačních vlastností MSC, které by mohly mít terapeutický efekt u celé řady autoimunitních onemocnění, včetně revmatoidní artritidy (Álvaro-Gracia et al. 2016), chronických zánětlivých onemocnění střev (Molendijk et al. 2015), systémové sklerodermie (Larghero et al. 2008) a mnoho dalších. MSC se také využívají pro potlačení akutní i chronické reakce štěpu proti hostiteli po transplantacích kostní dřeně (Zhao et al. 2015) nebo pro potlačení rejekční reakce u orgánových transplantací (Reinders et al. 2013). Terapie kmenovými buňkami se v současné době používá také v klinických studiích zaměřených na neurodegenerativní onemocnění, zejména roztroušenou sklerózu (Gharibi et al. 2015) či ALS (Mazzini et al. 2008), kde mohou MSC tlumit degenerativní proces i zánětlivé reakce.

Výhodou využití MSC oproti jiným typům kmenových buněk je jejich relativně snadná dostupnost, standardizovaný postup kultivace i stabilita a homogenita získané buněčné populace po poměrně dlouhou dobu v kultuře, což umožňuje získat dostatečné množství buněk pro účinnou terapii. Nezbytnou součástí efektivní terapie je i schopnost MSC migrovat do místa poškození. U některých onemocnění se dnes využívá i lokální aplikace buněk přímo do místa předpokládaného působení pro maximální zvýšení pozitivních účinků terapie.

4. Amyotrofická laterální skleróza

ALS, také nazývaná jako Lou Gehrigova nemoc, byla poprvé popsána v druhé polovině 19. století francouzským neurologem Jean-Martinem Charcotem (Charcot 1869). ALS je progresivní neurodegenerativní onemocnění, u kterého dochází k poškození a následnému zániku motoneuronů. V důsledku tohoto nervového poškození dochází nejprve k oslabení a následně ke ztrátě funkčnosti svalů, což vede k omezení hybnosti, polykání, mluvení a v konečném důsledku k atrofii dýchacích svalů a respiračnímu selhání obvykle do 5 let od stanovení diagnózy (Andersen et al. 2012).

Více než 90 % případů ALS vzniká spontánně a příčiny rozvoje ALS nejsou dosud zcela objasněny. U zbylých 10 % pacientů se vyskytuje familiární forma onemocnění spojená s dědičnou genetickou mutací. Nejčastěji se jedná o mutace v genu pro superoxid dismutázu 1 (SOD1), která je přítomna asi u 20 % případů familiární ALS. Průměrná světová incidence se pohybuje kolem 1,9/100 000 ročně a nejčastěji se nemoc objevuje kolem 60. roku života (Chiò et al. 2013). Mírně častěji se nemoc vyskytuje u mužů než u žen, udává se poměr 1,3 : 1 u skupiny pacientů s dřívějším nástupem onemocnění, u starších pacientů rozdílná incidence mezi pohlavími prakticky mizí (Mccombe et Henderson 2010).

Klinicky můžeme pacienty rozdělit do dvou skupin dle nástupu symptomů. Spinální (či končetinová) forma, která je častější u mužů, se zpočátku vyznačuje ztrátou hybnosti periferních svalů, zejména na končetinách. Bulbární forma, která je typičtější u žen, se projevuje nejprve obtížemi s mluvením a polykáním a spinální symptomy nastupují až později. Z dosavadních dat vyplývá, že charakter prvotních projevů onemocnění nemá vliv na délku přežití pacientů s ALS (Mccombe et Henderson 2010).

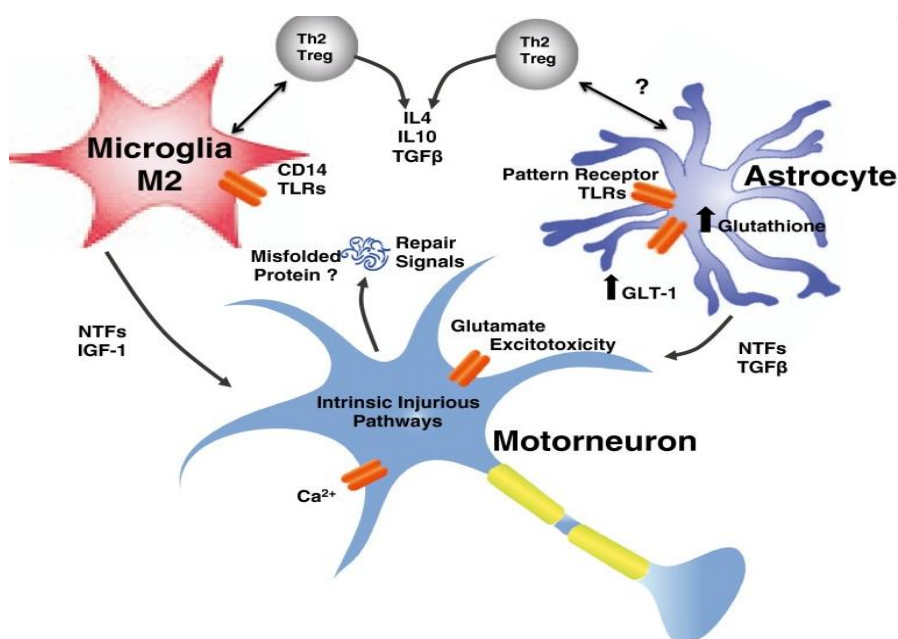
4.1. Imunitní systém v patogenezi ALS

I když přesná příčina rozvoje ALS nebyla doposud popsána, je zřejmé, že v patogenezi onemocnění hraje důležitou roli imunitní systém. Předpokládá se účast imunitních buněk z periferie i z CNS. Zánět je zřejmě klíčovým mechanismem poškození motoneuronů, což následně vede k jejich odumírání. Zánětlivé reakce se účastní složky přirozené i adaptivní imunity, přičemž prostup periferních leukocytů do CNS je umožněn porušením hematoencefalické bariéry, které je pro ALS typické. Aktivace a migrace leukocytů do CNS nasvědčuje tomu, že je ALS systémové onemocnění, spíše než porucha omezená pouze na CNS (Rodrigues et al. 2012).

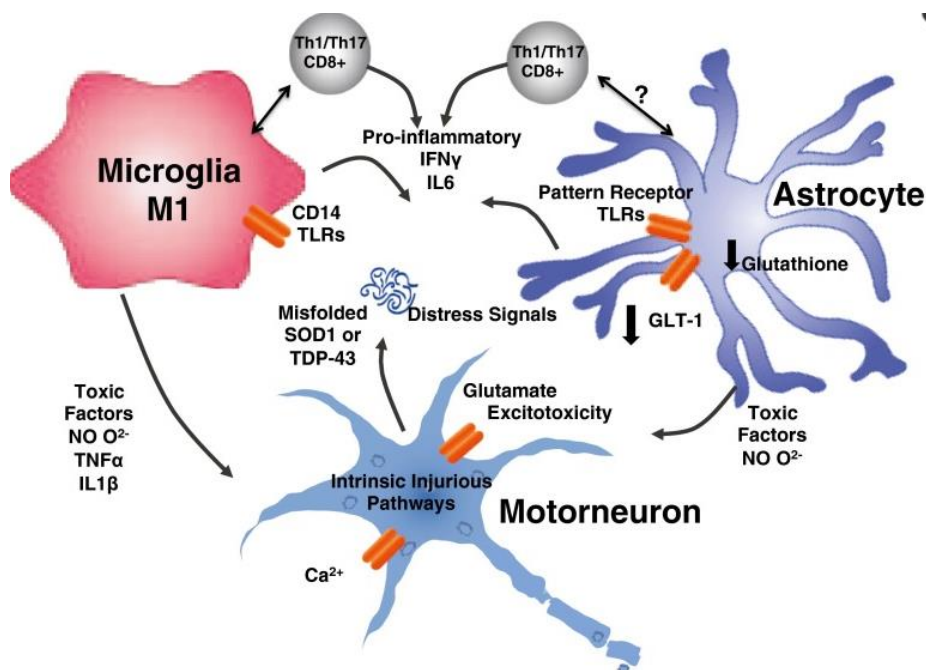
Poškození integrity hematoencefalické bariéry je zásadní událostí při rozvoji ALS. U pacientů byly zjištěny známky odumírání pericytů a poškození endotelových buněk a bazální laminy v místě probíhajícího zánětu. U endotelií dochází ke snížení exprese proteinů tvořících mezibuněčné spoje, jako jsou okcludiny či kadheriny, které tvoří základ těsných a adhezivních spojů hematoencefalické bariéry (Garbuzova-Davis et al. 2012).

Typickým znakem provázejícím rychlou progresi onemocnění je přesmyk z tolerogenního neuroprotektivního fenotypu Th2 a Treg lymfocytů, M2 makrofágů/mikroglíí, pDC a dalších (Obrázek 2) na prozánětlivý a neurotoxický fenotyp Th1, Th17, Tc lymfocytů, M1 makrofágů/mikroglíí a mDC vedoucí k rychlému odumírání motoneuronů a zhoršování stavu pacienta (Obrázek 3).

Na progresi onemocnění by se částečně mohly podílet i humorální složky imunity. Byly zjištěny jak imunokomplexy v krvi pacientů, tak také autoprotilátky v mozkomíšním moku, často cílené proti neuronálním strukturám. Není ale jasné, zda se autoprotilátky podílejí na patogenezi onemocnění nebo zda jde pouze o vedlejší reakci imunitního systému na přítomnost neuronálních antigenů na periférii (Fialová et al. 2010).



Obrázek 2: Neuroprotektivní fáze imunitní odpovědi v nervové tkáni. V počáteční fázi rozvoje onemocnění převládá časná protizánětlivá či neuroprotektivní odpověď gliových buněk a leukocytů. Tato časná fáze odpovědi je řízena Th2 a Treg lymfocyty, M2 mikroglíemi a podpůrnými astrocyty, které produkují neurotrofické faktory. GLT-1, glutamátový transportér; NTFs, neurotrofické faktory (převzato z: Hooten et al. 2015)



Obrázek 3: Cytotoxická fáze imunitní odpovědi v nervové tkáni. V pozdějších fázích onemocnění dochází k poškození motoneuronů v důsledku posunu od neuroprotektivní k neurotoxické odpovědi gliových buněk a leukocytů. K tomuto posunu dochází v důsledku odumírání motoneuronů, při kterém dochází k zesílení zánětu a uvolnění řady toxických faktorů. (převzato z: Hooten et al. 2015)

4.1.1. Role přirozené imunity v patogenezi ALS

Aktivace mikroglií je považována za hlavní spouštěč zánětu, který je následovaný poškozením a ztrátou motoneuronů u pacientů s ALS. Míra aktivace mikroglií dále koreluje se závažností příznaků a postupem onemocnění. Experimentální modely ALS ukázaly zvýšenou aktivaci mikroglií již v presymptomatickém stádiu ALS, což naznačuje zásadní roli mikroglií v patogenezi onemocnění. Aktivaci mikroglií a navození prozánětlivého M1 fenotypu mohou podporovat monocyty a makrofágy, které prostupují do CNS přes poškozenou hematoencefalickou bariéru. Důležitou roli hraje chemoatrakce mezi CCL2 exprimovaným aktivovanými mikrogliemi a CCR2 přítomným na prozánětlivých monocyttech. V průběhu progresu onemocnění aktivované monocyty pravděpodobně nahrazují mikroglie v roli hlavního původce zánětu (Zhao 2013).

S rychlou progresí ALS je spojována také zvýšená infiltrace DC do CNS, které zajišťují účinnou aktivaci imunitních mechanismů prezentací antigenů efektorovým buňkám (Henkel et al. 2004). Přesná role DC v patogenezi ALS ale nebyla dosud popsána.

Ve tkáních postižených ALS byla také pozorována aktivace klasické dráhy komplementu, která může významně přispívat k udržování zánětu. Poškozené neurony a

gliové buňky produkují C1q a C4 fragmenty komplementu, které mohou aktivovat komplementovou kaskádu. Aktivovaný komplement přitahuje fagocyty a opsonizuje membrány. Formováním lytického komplexu dochází k ještě většímu poškození nervových buněk. Fragment C1q může navíc aktivovat prozánětlivý fenotyp u mikroglíí, což může vést k poškození hematoencefalické bariéry, umožnění infiltrace periferních leukocytů a dalšímu rozvoji zánětu. Ve zdravém organismu je aktivita komplementu silně regulována, ale při rozvoji ALS dochází pravděpodobně k narušení těchto regulačních mechanismů a umožnění nadměrné aktivace (Sta et al. 2011).

4.1.2. Role adaptivní imunity v patogenezi ALS

Na progresi ALS se kromě složek přirozené imunity podílejí i některé populace T lymfocytů. V raných stádiích onemocnění se v CNS nacházejí téměř výhradně CD4⁺ T lymfocyty a z počátku u nich pozorujeme především protektivní Th2 a Treg fenotyp. S postupem onemocnění dochází k přesmyku na prozánětlivý Th1 a Th17 fenotyp a také k infiltraci CD8⁺ T lymfocytů do místa zánětu. Významná úloha protektivních Th lymfocytů v časných fázích onemocnění byla prokázána u zvířecího modelu, kde při depleci T lymfocytů docházelo k rychlejší progresi onemocnění. Th lymfocyty v časných fázích onemocnění ovlivňují mikroglie a astrocyty a podporují u nich neuroprotektivní působení na neurony (Beers et al. 2008).

Během rozvoje onemocnění dochází k posunu rovnováhy mezi populacemi CD4⁺ lymfocytů. V neurotoxické fázi onemocnění dochází ke snížení počtu Treg lymfocytů, které je doprovázeno poklesem hladiny IL-4 a IL-10, a k snížení počtu M2 mikroglíí. Zároveň se snižuje počet Th2 lymfocytů a zvyšuje počet Th1 lymfocytů, které indukují M1 neurotoxický fenotyp u mikroglíí, převládající v pozdějších fázích onemocnění. Význam Th17 lymfocytů v progresi ALS je prozatím pouze částečně popsán, ale současné poznatky naznačují jejich zapojení v zánětlivém procesu (Henkel et al. 2013). Interakce mezi T lymfocyty a mikroglíemi může zásadně ovlivňovat průběh onemocnění a navození protektivního prostředí a regulačního fenotypu mikroglíí pomocí Th lymfocytů by tak mohlo mít zásadní vliv na zpomalení progresu ALS.

Role B lymfocytů v patogenezi ALS není doposud zcela objasněna. V některých pracích byly detekovány autoprotilátky proti neuronálním strukturám, ale není jasné, zda mají vliv na patogenezi ALS nebo jsou jen důsledkem rozsáhlého odumírání neuronů (Niebroj-Dobosz et al. 2006; Fialová et al. 2010).

4.2. Buňky CNS v patogenezi ALS

Mikroglie

Mikroglie jsou považovány za buňky první obranné linie při infekci a poškození CNS. V časných fázích ontogeneze osidlují CNS a zastávají zde funkci rezidentních makrofágů. Mikroglie patří mezi APC a exprimují PRRs, včetně TLR2 a TLR4 a jejich koreceptoru CD14. V závislosti na prostředí a na spouštějícím stimulu mohou být mikroglie, podobně jako makrofágy, polarizovány na klasicky aktivované M1 a alternativně aktivované M2 (Michelucci et al. 2009). M1 mikroglie podporují rozvoj neurotoxických mechanismů T lymfocytů, zejména produkci reaktivních kyslíkových radikálů a prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-1. Naproti tomu alternativně aktivované M2 mikroglie navozují neuroprotektivní prostředí produkcí protizánětlivých cytokinů IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β a neurotrofických faktorů, jako například inzulinového růstového faktoru 1 a CD200 (Hooten et al. 2015; Tang et Le 2015).

V průběhu rozvoje ALS se významně mění polarizace mikroglíí. Během časných stádií pomalého rozvoje onemocnění převládá neuroprotektivní M2 fenotyp. Při přechodu do rychle progredujícího stádia se mění polarizace mikroglíí na neurotoxický M1 fenotyp a dochází k rozvoji silné zánětlivé reakce (Hooten et al. 2015).

Astrocyty

Astrocyty jsou hlavní podpůrné buňky neuronů a mají celou řadu komplexních funkcí, zajišťují jejich výživu propojením s krevním řečištěm a jsou hlavní složkou hematoencefalické bariéry. V patogenezi ALS přispívají k poškození neuronů v důsledku snížení exprese glutamátového transportéru-1, což vede k hromadění glutamátu, působícího cytotoxicky na neurony. Dále mohou astrocyty přispívat k nežádoucí imunitní odpovědi produkcí neurotoxických mediátorů, jako je CXX motiv chemokinů 10, CCL 2 či IL-6 produkovaných v důsledku aktivace přes TLR a manózoový receptor na jejich povrchu (Barbeito et al. 2004).

Oligodendrocyty

Oligodendrocyty jsou součástí podpůrné tkáně pro neurony a tvoří myelinové pochvy kolem axonů, základní složku bílé hmoty mozku a míchy. Zdá se, že oligodendrocyty jsou jedním z cílů poškození u ALS. Ke zvýšené míře apoptózy

oligodendrocytů zřejmě dochází již před nástupem klinických projevů onemocnění a před odumíráním vlastních motoneuronů. Zdá se, že na úbytek oligodendrocytů reagují NG2 gliové buňky (progenitory oligodendrocytů) a spouští svou zvýšenou proliferaci a diferenciaci, čímž se snaží nahradit množství odumřelých buněk. Vlivem zvýšené proliferace ale dochází k produkci funkčně i morfologicky poškozených buněk, které dále nejsou schopné zajistit dostatečnou myelinizaci axonů ani metabolickou podporu neuronů a mohou tak nepřímo přispívat k jejich následnému odumírání (Philips et al. 2013).

4.3. Léčba ALS

V současné době je ALS nevyléčitelné a smrtelné onemocnění. Léčebné i experimentální postupy se zaměřují zejména na zpomalení progresu onemocnění a zmírnění jeho projevů. V terapii pacientů s ALS je nezbytná multidisciplinární péče, do které se zapojuje celá řada specializovaných lékařů a dalších zdravotnických pracovníků. Diagnostický a léčebný postup je standardizován dle doporučení Evropské federace neurologických společností (Andersen et al. 2012).

ALS modifikující léčba

Od roku 1995 do současné doby je jediným schváleným léčivem s prokázaným neuroprotektivním účinkem Riluzol, u kterého klinické studie ukázaly prodloužení doby bez nutnosti přístrojové ventilace o 2-3 měsíce (Bensimon et al. 1994). Riluzol, chemicky 2-amino-6-(trifluoromethoxy)benzothiazol, je antagonistou glutamátu a blokuje jeho uvolňování na presynaptických nervových zakončeních, čímž dochází ke snižování hladiny glutamátu v postsynaptických zakončeních neuronů. Vzhledem k tomu, že je glutamát považován za jednu z hlavních neurotoxických látek způsobujících odumírání motoneuronů u ALS, je snížení jeho hladiny jedním z možných mechanismů neuroprotektce (Wagner et Landis 1997).

Symptomatická léčba

Nezbytnou součástí léčby pacientů s ALS je terapie zaměřená na zmírnění obtíží spojených s onemocněním a zlepšením kvality života nemocných. Ke konkrétním opatřením se přistupuje individuálně dle nástupu jednotlivých symptomů. Hlavní součástí je pohybová terapie pro zachování hybnosti a zmírnění projevů atrofie a spasticity. Dále se využívá farmakoterapie pro zmírnění bolesti, nadměrného slinění a při poruše polykání nejprve úprava stravy a poté enterální výživa sondou. Součástí péče

o nemocné je i psychoterapie a farmakoterapie pro zmírnění deprese, úzkosti či poruch spánku. Při rozvoji symptomů respiračního selhání se používá neinvazivní ventilační podpora a případně umělá plicní ventilace, která dokáže prodloužit život pacienta s ALS, ale nezlepší kvalitu jeho života (Andersen et al. 2012).

Experimentální terapie

V léčbě ALS bylo v klinických studiích testováno široké spektrum potencionálních léčiv či léčebných postupů včetně vitamínů, antioxidantů, cytokinů, imunoglobulinů či růstových faktorů a mnoho dalších (například N-acetylcystein, koenzym Q10, z mozku odvozený růstový faktor, z glií odvozený růstový faktor, inzulinový růstový faktor, IFN- β , lithium, verapamil, vitamin E). V dosud dokončených klinických testech byl prokázán účinek na progresi ALS pouze u Riluzolu. Vzhledem k jeho relativně malému účinku (prodloužení života o 2-3 měsíce) je nezbytné hledání účinnější terapie ALS. V současné době probíhá celá řada klinických testů zkoumajících účinnost dalších látek (například růstový faktor stimulující kolonie granulocytů, SOD1 antisense oligonukleotidy, VEGF a mnoho dalších) a také buněčné terapie se zaměřením na kmenové buňky (Andersen et al. 2012).

4.4. Léčba ALS pomocí kmenových buněk

4.4.1. mSOD1 model ALS

V posledním desetiletí je terapie kmenovými buňkami považována za možný způsob jak ovlivnit neurotoxické prostředí, které vzniká v důsledku aktivace mikroglíí a astrocytů a způsobuje poškození a následné odumírání motoneuronů u ALS. Pro studium ALS byl vytvořen transgenní myši a potkaní model, který nese mutaci v genu pro Cu/Zn SOD1, vyskytující se i u familiární formy ALS u lidí. Transgenní zvířata nesou mutantní lidský *SOD1* gen se substitucí glycinu za alanin na pozici kodonu 93 a jsou označována jako SOD1-G93A (převzato z databáze www.jax.org). Experimentální SOD1-G93A zvířata mají symptomy odpovídající klinickým i histopatologickým projevům lidské ALS a představují tak vhodný model pro studium tohoto onemocnění (Kato 2008).

Doposud byla provedena řada preklinických studií poukazující na příznivý vliv MSC na zpomalení progresse onemocnění. Četné *in vitro* studie prokázaly rozsáhlé diferenciační i imunomodulační účinky MSC, avšak komplexnější *in vivo* modely pomáhají odhalit, jakými mechanismy MSC působí při léčbě ALS a zda nedochází

k nežádoucím interakcím, které by naopak mohly podpořit progresi onemocnění a ohrozit pacienty.

Klíčové je nyní studium účinnosti terapie kmenovými buňkami a objasnění mechanismů jejich vlivu na zpomalení progresu ALS. Při presymptomatické aplikaci MSC bylo pozorováno oddálení nástupu projevů onemocnění a prodloužení délky života pokusných zvířat (Gubert et al. 2016; Uccelli et al. 2012). V další studii byla potvrzena schopnost MSC přežít v organismu a migrovat z oběhu do CNS (Zhao et al. 2007). Forostyak et al. (2014) pozorovali prospěšný vliv MSC na průběh onemocnění i při aplikaci buněk až po nástupu prvotních projevů onemocnění, což je důležité zejména pro jejich klinické využití, protože se většina případů ALS objevuje sporadicky a léčba tak může být zahájena až po stanovení diagnózy.

Jako důležitý faktor se také ukazuje způsob aplikace MSC. Při systémovém podání mohou sice buňky migrovat do poškozené tkáně, ale větší efektivity bylo dosaženo lokální aplikací MSC do páteřního kanálu (Vercelli et al. 2008), případně při kombinaci systémového a lokálního podání buněk (Forostyak et al. 2011). Dalším důležitým faktorem významně ovlivňujícím efektivnost léčby je množství podaných buněk. Kim et al. (2010) pozorovali signifikantní efekty při podání 1×10^6 buněk oproti množství 1×10^4 buněk a negativní kontrole.

V několika studiích byly testovány imunomodulační a neuroprotektivní účinky MSC *in vivo*. Vercelli et al. (2008) pozorovali potlačení aktivace mikroglie a astrocytózy a také oddálení nástupu symptomů onemocnění po intrathekálním podání MSC. Boido et al. (2014) dále poukázali na změny v produkci prozánětlivých a imunomodulačních molekul rezidentními buňkami CNS v důsledku působení aplikovaných MSC, což potvrzují i výsledky studie Forostyak et al. (2011).

Vzhledem k poměrně krátkému trvání účinků aplikovaných MSC (v řádu několika měsíců) se zdá, že pro lepší výsledky bude nezbytné podání MSC opakovat (Marconi et al. 2013). Na myších modelech i v klinickém hodnocení byla již prokázána bezpečnost opakovaného podání MSC (Gothelf et al. 2014; Oh et al. 2015).

4.4.2. Terapeutické využití MSC u ALS

Experimentální modely jsou velice důležité při vývoji nových léků a léčebných přístupů. Pro zavedení do klinické praxe je ale nezbytné provést klinické studie potvrzující terapeutické účinky u lidí. V návaznosti na pozitivní výsledky preklinických testů aplikace kmenových buněk u transgenního myšího modelu ALS jsou MSC

považovány za nadějně kandidáty pro léčbu ALS (Gharibi et al. 2015). Jak již bylo popsáno výše, MSC disponují imunomodulačními účinky ovlivňující složky přirozené i adaptivní imunity, produkují mnoho antiapoptotických a růstových faktorů a celkově tlumí zánětlivou odpověď, což by mohlo mít pozitivní efekt při léčbě řady neurodegenerativních onemocnění včetně ALS.

Buněčná terapie ALS má dva hlavní cíle, prvním a v současnosti poměrně vzdáleným, je přímé nahrazení odumřelých motoneuronů a obnova jejich funkčnosti. To vyžaduje dlouhodobé přežívání, usídlení v poškozené tkáni, cílenou diferenciaci a integraci kmenových buněk do nervové tkáně. Druhým cílem je navodit neuroprotektivní prostředí a zamezit tak dalšímu poškození v důsledku cytotoxického působení probíhající nemoci. V současné době probíhají i klinické studie využívající geneticky modifikovaných MSC, u kterých je navozena zvýšená produkce neurotrofických faktorů, které by tak mohly efektivněji zpomalovat progresi ALS (Tabulka 1). Na neuroprotektivním působení MSC se podílejí jednak sekretované růstové faktory a také imunomodulační molekuly, které by mohly vést k utlumení zánětu a k potlačení nežádoucího odumírání motoneuronů. Klinické studie využívající pro terapii ALS kmenové buňky jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled klinických studií (clinicaltrials.gov, clinicaltrialsregister.eu) a publikovaných výsledků týkajících se použití kmenových buněk v terapii ALS

Kód klinické studie	rok	stát	typ buněk	aplikace
NCT00855400	2007-2010	Španělsko	BM-MSC	i.t.
NCT01051882	2011-2013	Izrael	BM-MSC NTF	i.t. vs. i.m.
NCT01082653	2010-2014	USA	MNC	i.t.
NCT01142856	2010-2011	USA	AT-MSC	i.t.
NCT01254539	2010-2015	Španělsko	MNC + BM-MSC	i.t.
NCT01348451	2009-2016	USA	NSC	i.s.
NCT01363401	2011-2013	Korea	MNC	i.t.
NCT01494480	2011-2015	Čína	UC-MSC	i.t.
NCT01609283	2012-2016	USA	AT-MSC	i.t.
NCT01640067	2011-2015	Itálie	NSC	i.t.
NCT01730716	2013-2016	USA	NSC	i.t.
NCT01758510	2012-2014	Korea	BM-MSC alogenní	i.t.
NCT01759797	2013-2014	Irán	BM-MSC	i.v.
NCT01771640	2013-2014	Irán	BM-MSC	i.t.
NCT01777646	2012-2014	Izrael	BM-MSC NTF	i.t.+i.m.
NCT01933321	2012-2014	Mexiko	HSC	i.t.
NCT01984814	2008-2013	Indie	BM-MSC	i.t.+i.m.
NCT02017912	2014-2016	USA	BM-MSC NTF	i.t.+i.m.
NCT02058732	2013-2019	USA	MSC	i.t.
NCT02116634	2014-2017	Irán	MSC	i.s.
NCT02193893	2010-2017	Polsko	MNC	i.t.
NCT02242071	2008-2016	Indie	MNC	n/a
NCT02286011	2014-2016	Španělsko	MNC	i.m.
NCT02290886	2014-2019	Španělsko	AT-MSC	i.v.
NCT02383654	2015-2016	Taiwan	AT-MSC	i.t.
NCT02478450	2015-2017	USA	GRPC	i.t.
NCT02492516	2014-2016	Izrael	AT-MSC	i.v.
2011-000362-35	2012-2015	ČR	BM-MSC	i.t.
Deda et al.	2009	Turecko, USA	MNC	i.s.
Feldman et al.	2014	USA	NSC	i.s.
Karussis et al.	2011	Izrael	BM-MSC	i.t.
Kim et al.	2014	Jižní Korea	BM-MSC	i.t.
Mazzini et al.	2008	Itálie	BM-MSC	i.t.
Mazzini et al.	2012	Itálie	BM-MSC	i.t.
Oh et al.	2015	Korea	BM-MSC	i.t.
Petrou et al.	2016	Izrael	BM-MSC NTF	i.t.

AT- tuková tkáň, BM – kostní dřeň, GRPC – progenitorové buňky prediferencované v gliu
MNC - jaderné buňky z kostní dřeně, NSC – neurální kmenové buňky, NTF – neurotrofické faktory, UC – pupečník, i.m. - intramuskulárně, i.s. – intraspinálně, i.t. –intrathekálně, i.v. - intravenózně.

Materiál a Metody

5. Materiál

5.1. Používané buňky

V experimentech byly využity MSC získané z kostní dřeně pacientů s ALS a v kontrolní skupině MSC pacientů podstupujících převážně ortopedické operace (Tabulka 2). K experimentálním účelům byla použita přebytečná kostní dřeň a všichni dárči podepsali informovaný souhlas s využitím nadbytečných buněk pro experimentální účely.

PBMC byly získávány z buffy coatu z periferní krve dobrovolných dárců transfuzního oddělení Thomayerovy nemocnice v Praze 4 – Krči.

Tabulka 2: Složení skupiny pacientů s ALS a kontrolní skupiny

ALS skupina		kontrolní skupina	
věk	pohlaví	věk	pohlaví
47	Ž	26	M
54	M	26	Ž
43	Ž	60	M
52	M	59	M
63	M	72	Ž
38	M	55	M
55	M	61	M
38	M	25	M
48	M	40	M
44	M	55	M
53	M	25	M
39	M	62	M
39	M	59	Ž
55	M	68	Ž
		55	M
Průměr = 47,7	M = 12 Ž = 2	Průměr = 49,5	M = 11 Ž = 4

5.2. Roztoky a média

- MSC byly kultivovány v Alfa MEM médiu (Lonza, Basilej, Švýcarsko) doplněném o 5 % destičkového lyzátu (IKEM, Praha, ČR) a gentamicin (Sandoz, Basilej, Švýcarsko) ve výsledné koncentraci 10 µg/ml. Toto médium je v následujícím textu označováno jako kompletní 5% médium Alfa MEM.

- PBMC byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) s přídavkem 5 % nebo 10 % tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (Gibco, Waltham, MA), penicilinu (Sigma Aldrich) ve výsledné koncentraci 100 U/ml, streptomycinu (Sigma Aldrich) ve výsledné koncentraci 100 µg/ml a HEPES pufru (Sigma Aldrich) v koncentraci 10 mM. Toto médium je v následujícím textu označováno jako kompletní médium RPMI 1640.
- PBS (*phosphate buffered saline*) byl používán ve složení 0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,24 g KH₂PO₄, 1,44 g Na₂PO₄ a 1 l destilované vody, pH upraveno na 7,2 (připravovaný v servisní laboratoři Ústavu molekulární genetiky, AV ČR).
- Pro disociaci adherentních buněk byl používán 1 ml enzymu CTS TrypLE Select (Gibco) a pro zastavení jeho účinků byl použit 1 ml 20% roztoku lidského albuminu (Grifols, Barcelona, Španělsko).

5.3. Technické vybavení

- ABX MICROS 60 (Horiba, Kyoto, Japonsko)
- Centrifuga Universal 32 (Hettich, Beverly, MA)
- Centrifuga Universal 320R (Hettich)
- CO₂ inkubátor (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko)
- Cycler PTC-200 (MJ Research, St. Bruno, Kanada)
- Cycler StepOne Plus RT-PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)
- Invertovaný mikroskop Olympus IX81, vybavený kamerou Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG (Olympus, Tokio, Japonsko)
- Laminární box Clean Air (Telstar, Terrassa, Španělsko)
- Minicentrifuga Cleaver (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK)
- Optický mikroskop Olympus CKX31(Olympus)
- Optický mikroskop Olympus CX41 (Olympus)
- Průtokový cytometr LSR II (BD, Franklin Lakes, NJ)
- Spektrofotometr Nanophotometer Pearl (Implen, Mnichov, Německo)
- Spektrofotometr Sunrise (Tecan, Männedorf, Švýcarsko)
- Stahovač buněk Harvester 96, MACH III M (Tomtec, Hamden, CT)
- Vortex IKA MS1 minishaker (IKA Works, Wilmington, NC)

5.4. Použitý software

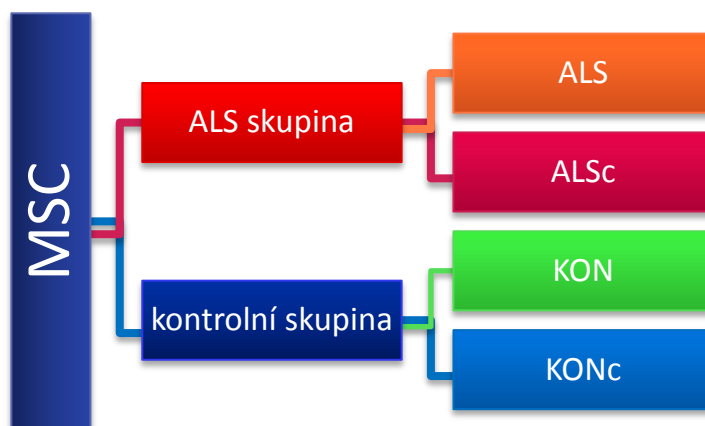
- FACSDiva Software (BD) – ovládací software pro průtokový cytometr
- FlowJo 9.9.3. (LLC, Ashland, OR) – vyhodnocovací software pro data získaná na průtokovém cytometru
- GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) – software pro statistické a grafické zpracování dat
- Kim 32 (Schoeller instruments, Praha, Česká republika) – software pro zpracování spektrofotometrických dat
- Microsoft Excel (Microsoft, Albuquerque, NM) – software pro statistické a grafické zpracování dat
- Olympus Soft Imaging Solutions 31 (Olympus) – software pro invertovaný mikroskop
- StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems) – software pro zpracování dat z kvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR, *polymerase chain reaction*)

6. Metody

6.1. Izolace a kultivace MSC

MSC byly separovány z kostní dřevě o objemu 12 ml odebrané z lopaty pánevní kosti. Odebraná kostní dřevě byla smíchána se 3 ml gelofusinu (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo) a sedimentací byla izolována vrstva jaderných buněk a plazmy. Na hematologickém analyzátoru ABX MICROS 60 (Horiba) bylo následně stanoveno množství jaderných buněk. Buňky byly kultivovány v 75 cm² kultivačních lahvích (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře v koncentraci 1 x 10⁶ jaderných buněk/ml s 10 ml kompletního 5% média Alfa MEM. Po dosažení konfluence byly buňky disociovány pomocí 1 ml enzymu CTS TrypLE Select (Gibco), jehož působení bylo zastaveno 1 ml 20% lidského sérového albuminu (Grifols). Ve 2. pasáži (obvykle 16 dnů od nasazení) byly buňky zamrazeny v koncentraci 1x10⁶ buněk/ml v kompletním 10% médiu RPMI 1640 s 10 % DMSO (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) v CoolCell (BioCision, San Rafael, CA) a skladovány při -80 °C po dobu 24 hodin. Kryozkumavky (Nunc, Roskilde, Dánsko) byly následně přemístěny do par tekutého dusíku, kde byly uchovávány pro další použití.

Před testováním byly buňky rozmrazeny, kultivovány do konfluence a všechny experimenty byly prováděny na MSC ve 3. pasáži. Polovina buněk od každého pacienta byla stimulována 24 hodin před testováním vybranými lidskými cytokiny - IFN- γ , TNF- α a IL-6 (vše Peprotech, Rocky Hill, NJ) ve výsledné koncentraci 10 ng/ml (Obrázek 4).

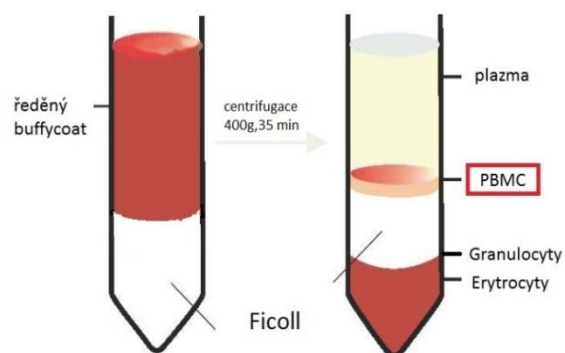


Obrázek 4: Schéma rozložení testovaných MSC. Testované MSC byly rozděleny do čtyř skupin. MSC z ALS skupiny jsou označovány jako ALS, MSC z ALS skupiny ovlivněné cytokiny jako ALSc. MSC z kontrolní skupiny jsou označovány jako KON a MSC z kontrolní skupiny ovlivněné cytokiny jako KONc.

6.2. Izolace PBMC

PBMC byly využívány ve funkčních testech MSC jako reaktivní buňky. Pro jejich izolaci byly zpracovány 2 buffy coaty o objemu 57 a 64 ml. Buffy coaty byly naředěny 1 : 1 v PBS a po 8 ml opatrně navrstveny na 6 ml Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, Chicago, IL) do 15 ml zkumavek (Biologix, Shandong, Čína). Následně byly zkumavky centrifugovány (400 g, 35 minut).

Po centrifugaci se ve zkumavkách oddělily vrstvy plazmy, PBMC a granulocytů s erytrocyty (Obrázek 5). Nejprve byla opatrně odsáta vrchní vrstva plazmy a následně byl odebrán prstenek mononukleárních buněk, které byly přeneseny do nové zkumavky, doplněny



Obrázek 5: Rozložení buněčných frakcí po separaci buffy coatu na ficollu. převzato z <http://www.bio-protocol.org> a upraveno.

6 ml kompletního 5% média RPMI 1640 a centrifugovány (170 g, 8 minut) za účelem odstranění zbytků ficollu. Poté byl ze zkumavek odstraněn supernatant a buňky byly ještě 2krát stejným způsobem centrifugovány.

Pelety byly resuspendovány v malém množství kompletního 10% média RPMI 1640, spojeny do 50 ml zkumavky (Biologix) a doplněny médiem do objemu 30 ml. Pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena koncentrace buněk, která byla následně upravena na 14×10^6 buněk/ml.

Buněčná suspenze byla rozdělena po 1,6 ml do kryozkumavek (Nunc) a doplněna 0,2 ml DMSO (Serva). Zkumavky byly zamrazeny v CoolCell, skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin a následně přemístěny do par tekutého dusíku, kde byly uchovávány pro další použití.

Před použitím bylo rozmrazeno požadované množství PBMC, převedeno do centrifugačních zkumavek a doplněno kompletním 5 % médiem RPMI 1640. Následně byly buňky 2krát centrifugovány (170 g, 8 minut) za účelem odstranění DMSO a pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena jejich koncentrace.

6.3. Charakterizace MSC

6.3.1. Test metabolické aktivity MSC pomocí WST-1

Pro srovnání růstové a metabolické aktivity MSC byl proveden test WST-1 (*water soluble tetrazolium 1*) (Millipore, Billerica, MA). Buňky byly kultivovány v 96jamkové destičce (Nunc) v počáteční koncentraci $0,15 \times 10^6$ buněk/ml (v dalších jamkách se koncentrace snižovala vždy na polovinu) ve 100 μl kompletního 5% média Alfa MEM. K MSC bylo po 48 hodinách kultivace přidáno 11 μl roztoku WST-1 (Millipore), promícháno na třepačce (2 minuty) a 3 hodiny inkubováno při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 5% CO_2 atmosféře. Následně byla měřena absorbance na spektrofotometru Sunrise (Tecan) za použití měřícího filtru 450 nm a referenčního filtru 550 nm.

6.3.2. Diferenciace MSC

Pro ověření diferenciačního potenciálu byly MCS *in vitro* diferencovány v adipocyty a osteoblasty působením směsi diferenciačních činidel. Výsledky byly hodnoceny mikroskopicky invertovaným mikroskopem Olympus IX81 a exprese diferenciačních znaků byla hodnocena real-time PCR.

Pro testování diferenciačního potenciálu byly MSC kultivovány ve 24jamkových kultivačních destičkách (TPP), přičemž pro mikroskopii byla navíc na dno umístěna

kulatá krycí sklíčka o průměru 12 mm (Assistent, Sondheim, Německo). MSC byly kultivovány v počáteční koncentraci $0,06 \times 10^6$ buněk/ml kompletního 5% média Alfa MEM doplněného směsí diferenciačních faktorů. Médium bylo měněno každé 3-4 dny. Kromě jamek stimulovaných činidly byly rovněž kultivovány kontrolní jamky bez přidání diferenciačních činidel.

Protokol adipogenní diferenciace trval 14 dní a indukční médium obsahovalo 0,1 μ M dexametazon, 0,5 mM 3-izobutyl-1-metylxantin, 0,1 mM indometacin a 0,5 μ g/ml inzulinu (vše Sigma-Aldrich).

Protokol osteogenní diferenciace trval 21 dní a indukční médium obsahovalo 0,1 μ M dexametazon, 0,1 mM kyselinu L-askorbovou, 10 mM pentahydrát disodné soli β -glycerolfosfátu (vše Sigma-Aldrich).

MSC v jamkách se sklíčky pro mikroskopickou analýzu byly následně fixovány 4% roztokem formaldehydu (Lachema, Brno, Česká republika) 1 hodinu při laboratorní teplotě, a poté byly opláchnuty 1 ml PBS a uchovávány v PBS v chladničce až do barvení. MSC v jamkách určených ke stanovení exprese genů charakteristických pro adipocyty nebo osteoblasty byly převedeny do 500 μ l činidla TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) a vzorky byly zamrazeny a uchovávány při -80 °C a následně testovány metodou real-time PCR.

Pro barvení lipidových vakuol v adipocytech byl použit zásobní roztok Oil Red O (Sigma-Aldrich) (3,5 mg/ml v izopropanolu (Penta)), který byl dále ředěn v destilované vodě (3 díly roztoku Oil Red O a 2 díly destilované vody). Z jamek bylo nejprve odstraněno PBS, sklíčka byla opláchnuta 300 μ l 60% izopropanolu a po úplném oschnutí bylo do jamek přidáno 300 μ l ředěného Oil Red O na 10 minut. Barvicí roztok byl odstraněn a jamky byly 4krát promyty destilovanou vodou.

Pro barvení kalciových depozit v osteoblastech byl použit roztok Alizarin Red S (Sigma-Adrich) (20 mg/ml v destilované vodě, pH upraveno na 4,2). Po odstranění PBS bylo do jamek přidáno 300 μ l roztoku Alizarin Red S na 5 minut. Barvicí roztok byl odstraněn a jamky byly 4krát promyty destilovanou vodou.

Mikroskopie a real-time PCR

Po barvení byla krycí sklíčka montována na podložní sklo pomocí roztoku Mowiol 4-88 Reagent (Calbiochem, San Diego, CA), mikroskopické snímky byly pořízeny mikroskopem Olympus IX81 (Olympus).

Pomocí real-time PCR byla testována exprese genů charakteristických pro adipocyty - adiponektin (*ADPC*, *adiponectin*) a *PPARG* (*peroxisome proliferator activated receptor gamma*) a exprese genu charakteristického pro osteoblasty - osteopontin (*OPN*).

6.3.3. Fenotypová charakterizace MSC pomocí průtokové cytometrie

Metodou průtokové cytometrie byla u MSC stanovena exprese vybraných povrchových znaků. Pro zjištění fenotypu MSC byly použity monoklonální protilátky (mAb, *monoclonal antibody*) proti 2 pozitivním znakům MSC - CD44 a CD105 a 2 negativním znakům - CD11b a CD45 (Tabulka 3).

Tabulka 3: mAb použité pro fenotypizaci MSC

Znak	Fluorochrom	Klon protilátky	Izotyp protilátky	Reaktivita	Použitá koncentrace (µg/ml)	Výrobce
CD11b	allophycocyanin	M1/70	potkaní IgG2b	člověk/myš	4	BioLegend
CD44	allophycocyanin	IM7	potkaní IgG2b κ	člověk/myš	4	BioLegend
CD45	FITC	HI30	myší IgG1 κ	člověk	10	BioLegend
CD105	FITC	43A3	myší IgG1 κ	člověk	20	BioLegend

FITC – fluorescein isothiocyanate, BioLegend (San Diego, CA)

Přibližně $0,5 \times 10^6$ MSC bylo naředěno v 600 µl PBS a rozpipetováno do 3 jamek 96jamkové destičky s kulatým dnem (Nunc). Destička byla centrifugována (140 g, 3 minuty) a následně byly jamky promyty PBS, znovu centrifugovány a po odstranění supernatantu byly pelety rozvolněny na vortexu. K buňkám bylo přidáno 10 µl směsi protilátek v koncentraci dle Tabulky 3. Jedna jamka byla ponechána neoznačená jako negativní kontrola, druhá označena kombinací protilátek proti leukocytárním znakům CD11b a CD45, třetí značena kombinací protilátek proti pozitivním znakům MSC CD44 a CD105. Buňky byly inkubovány 30 minut v temnu při 4 °C. Po uplynutí doby inkubace byly vzorky 2krát promyty 200 µl PBS, centrifugovány (140 g, 3 minuty) a pelety byly rozvolněny a resuspendovány ve 200 µl PBS. Před měřením bylo ke vzorkům přidáno 20 µl roztoku Hoechst 33258 (Sigma Aldrich) v koncentraci 1 µg/ml. Následně byly buňky testovány na průtokovém cytometru LSR II (BD) a získaná data byla analyzována pomocí softwaru FlowJo 9.9.3. (LLC).

6.4. Funkční testy MSC

6.4.1. Inhibice proliferace lymfocytů

Vliv MSC na proliferaci PBMC stimulovaných PHA (Pharmacia, New Jersey, NJ) byla stanovena měřením inkorporace radioaktivního ^3H -thymidinu. V 96jamkové destičce bylo kultivováno 100 μl PBMC (z koncentrace $1,2 \times 10^6$ buněk/ml), ke kterým bylo přidáno 50 μl MSC (z počáteční koncentrace od $0,48 \times 10^6$ buněk/ml, ve výsledném poměru 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1, 40 : 1, 80 : 1 a 160 : 1) a 50 μl PHA (10 $\mu\text{g/ml}$), vše v kompletním 10% médiu RPMI 1640. Po 72 hodinách kultivace bylo ke vzorkům přidáno množství ^3H -thymidinu odpovídající 1 μCi (PE Systems, Waltham, MA) a inkubováno dalších 6 hodin při 37 °C v 5% CO_2 atmosféře. Pomocí sběrače buněk Harvester 96 (Tomtec) byly vzorky převedeny na filtrační papír (GE Healthcare) a inkorporovaná aktivita byla měřena po přidání scintilačního roztoku v servisní laboratoři MBÚ AV ČR.

6.4.2. Stanovení produkce cytokinů pomocí ELISA

Ve 48jamkové destičce (TPP) bylo v celkovém objemu 1000 μl kompletního 10% média RPMI 1640 kultivováno 500 μl PBMC (z koncentrace $1,2 \times 10^6$ buněk/ml), 250 μl MSC (z koncentrace od $0,12 \times 10^6$ buněk/ml - v poměru 20 : 1, 40 : 1, 80 : 1, 160 : 1) a 250 μl PHA (10 $\mu\text{g/ml}$, Pharmacia) nebo lipopolysacharidu (LPS) (5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich). Dále bylo ve 48jamkové destičce (TPP) v celkovém objemu 1000 μl kompletního 10% média RPMI 1640 kultivováno 500 μl MSC (z koncentrace $0,06 \times 10^6$ buněk/ml) samotných nebo stimulovaných 500 μl LPS (5 $\mu\text{g/ml}$). Po 48 hodinách kultivace byly sbírány supernatanty v objemu 220 μl pro každý stanovovaný cytokin.

Metodou ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) byla v supernatantu stanovována koncentrace IL-10, IFN- γ , TNF- α a HGF pomocí DuoSet ELISA kitů (R&D Systems, Mineapolis, MN) a všechny reagentie byly použity v koncentracích doporučených výrobcem. Do 96jamkové destičky s vysokoabsorpčním povrchem (Costar, Cambridge, MA) bylo naneseno 100 μl primární protilátky a přes noc inkubováno při laboratorní teplotě. Destičky byly 3krát promyty promývacím pufrem (0,05% Tween 20 v PBS) a následně byl na 1 hodinu při laboratorní teplotě přidán blokovací roztok (1% BSA (*bovine serum albumine*) v PBS). Poté byly destičky 3krát promyty promývacím roztokem. Do takto připravených destiček byly napipetovány po 100 μl testované supernatanty a standardy pro dané cytokiny. Destičky byly inkubovány 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byly destičky 3krát

promyty. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l detekční protilátky v reakčním pufru (0,1% BSA v PBS pro TNF- α , IL-10 a HGF; 0,1% BSA a 0,05% Tween 20 v TRIS pufru pro IFN- γ) a destičky byly inkubovány 2 hodiny. Po 3 promývacích cyklech bylo přidáno 100 μ l roztoku Streptavidin peroxidázy do každé jamky a destička byla inkubována 20 minut v temnu při pokojové teplotě. Destička byla znovu 3krát promyta a na 20 minut v temnu bylo přidáno 100 μ l substrátu (H_2O_2 : tetramethylbenzidin, 1 : 1, R&D Systems). Přidáním 50 μ l 2M roztoku kyseliny sírové (PENTA) byla reakce zastavena a intenzita zabarvení byla detekována na spektrofotometru Sunrise (Tecan): měřicí filtr 450 nm a referenční filtr 550 nm. Naměřená optická densita byla následně přepočítána pomocí programu KIM 32 na produkci v pg/ml (na základě ředící řady standardu daného cytokinu).

6.4.3. Real-time PCR

Expres genů pro imunomodulační molekuly a diferenciatní znaky u MSC a změna exprese genů pro vybrané cytokiny u PBMC byla stanovena metodou real-time PCR. Při stanovení exprese genů pro imunomodulační molekuly bylo $0,4 \times 10^6$ MSC přeneseno do mikrozkuvek (Neptune Scientific, San Diego, CA), centrifugováno (1600 g, 5 minut), buněčná peleta byla resuspendována v 500 μ l činidla TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) a vzorky byly zamrazeny a uchovávány při -80 °C.

Po rozmrazení byla ze vzorků izolována RNA. Ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l chloroformu (Penta), vzorky byly důkladně promíchány a následně ponechány 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byly zkumavky centrifugovány (12 000 g, 15 minut, 4 °C). Do nových mikrozkuvek bylo převedeno 200 μ l vrchní čiré fáze, doplněno stejným množstvím izopropanolu (Penta) a důkladně promícháno. Zkumavky byly ponechány 10 minut při laboratorní teplotě a centrifugovány (12 000 g, 10 minut, 4 °C). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletám bylo přidáno 500 μ l 75% etanolu (Penta), mikrozkuvky byly následně centrifugovány (1600 g, 5 minut). Etanol byl poté odstraněn, pelety osušeny na vzduchu a resuspendovány na ledu v 10 μ l PCR vody (Top-Bio, Praha, Česká republika). Vzorky byly zamrazeny při -80 °C či přímo použity k reverzní transkripci.

Pomocí Nanophotometer Pearl (Implen) byla stanovena koncentrace vyizolované RNA. Pro reverzní transkripci do cDNA (*complementary DNA*) bylo použito množství odpovídající 1 μ g RNA a objem byl doplněn PCR vodou (Top-Bio) do 8 μ l. K roztoku

byly přidány 2 μ l směsi DNázy I (Promega, Madison, WI) o koncentraci 1 U/ μ l a reakčního pufru DNázy I (Promega) v poměru 1 : 1. Vzorby byly inkubovány v cycleru PTC-200 (MJ research) 30 minut při 37 °C. Ke vzorkům bylo přidáno po 1 μ l RQ1 DNase STOP solution (Promega) a následovala inkubace v cycleru 10 minut při 65 °C. Vzorby byly rychle zchlazeny na ledu a doplněny 14 μ l reakční směsí (5 μ l M-MLV Reaction Buffer (Promega), 5 μ l dNTP (z koncentrace 40mM, Promega), 1 μ l random primerů (z koncentrace 100 ng/ μ l, Promega), 0,5 μ l inhibitoru ribonukleáz (z koncentrace 40 U/ μ l, Promega), 0,5 μ l reverzní transkriptázy M-MLV (z koncentrace 200 U/ μ l, Promega) a 2 μ l PCR vody (Top-Bio)). Vzorby byly inkubovány v cycleru 60 minut při 37 °C a poté skladovány při -20 °C. Relativní míra exprese vybraných genů (Tabulka 4) byla analyzována metodou real-time PCR za použití referenčního genu glyceraldehyd dehydrogenázy (GAPDH, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

Tabulka 4: Seznam primerů použitých pro real-time PCR

Testovaný gen	Sekvence primeru
<i>GAPDH</i> (S)	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
<i>GAPDH</i> (A)	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
<i>IFN-γ</i> (S)	5'-ATATTGCAGGCAGGACAACC-3'
<i>IFN-γ</i> (A)	5'-TCATCCAAGTGATGGCTGAA-3'
<i>IL-10</i> (S)	5'-GGTGATGCCCAAGCTGA-3'
<i>IL-10</i> (A)	5'-TCCCCCAGGGAGTTCACA-3'
<i>IL-17F</i> (S)	5'- CCGTTCCCATCCAGCAAGAG -3'
<i>IL-17F</i> (A)	5'- ACAGTCACCAGCACCTTCTC -3'
<i>TSG-6</i> (S)	5'-GGCCATCTCGCAACTTACA-3'
<i>TSG-6</i> (A)	5'-CAGCACAGACATGAAATCCAA-3'
<i>TGF-β</i> (S)	5'-TATCGACATGGAGCTGGTGAAG-3'
<i>TGF-β</i> (A)	5'-CAGCTTGGACAGGATCTGGC-3'
<i>IDO</i> (S)	5'-GCCAGCTTCGAGAAAGAGTTG-3'
<i>IDO</i> (A)	5'-ATCCCAGAACTAGACGTGCAA-3'
<i>IL-6</i> (S)	5'-GACCCAACCACAAATGCCA-3'
<i>IL-6</i> (A)	5'-GTCATGTCCTGCAGCCACTG-3'
<i>VEGF</i> (S)	5'-CCCCTGAGGAGTCCAACAT-3'
<i>VEGF</i> (A)	5'-AAATGCTTTCTCCGCTCTGA-3'
<i>COX-2</i> (S)	5'-GTGCAACACT TGAGTGGCTAT-3'
<i>COX-2</i> (A)	5'-AGCAATTTGCCTGGTGAATGAT-3'
<i>PD-L1</i> (S)	5'-GGTGAGGATGGTTCTACACAG-3'
<i>PD-L1</i> (A)	5'-GAGAACTGCATGAGGTTGC-3'
<i>PPARG</i> (S)	5'-CAGGAGATCACAGAGTATGCCAA-3'
<i>PPARG</i> (A)	5'-TCCCTTGTCATGAAGCCTTGG-3'
<i>ADPC</i> (S)	5'-GATGAGAGTCCTGGGTGTGAG-3'
<i>ADPC</i> (A)	5'-CTGGGTAGATATGGGATTCAAGAGA-3'
<i>OPN</i> (S)	5'-CAGTTGTCCCCACAGTAGACAC-3'
<i>OPN</i> (A)	5'-GTGATGTCCTCGTCTGTAGCATC-3'

(S) – sense, (A) - antisense

K přešvané cDNA bylo přidáno 50 μ l PCR vody (Top-Bio). Do 96jamkové PCR destičky (Life Technologies, Carlsbad, CA) bylo přeneseno 7 μ l směsi složené z 0,5 μ l sense a 0,5 μ l antisense primeru (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR), 1 μ l PCR vody (Top-Bio) a 5 μ l Power SYBR Green PCR master MIX (Applied Biosystems). Ke směsi byly přidány 3 μ l roztoku cDNA příslušného vzorku.

V cycleru StepOne Plus RT-PCR System (Applied Biosystems) byla provedena real-time PCR. Použitý program zahrnoval denaturaci (3 minuty při 95 °C) a 40 cyklů s následujícím teplotním profilem:

- denaturace 20 sekund při 95 °C
- hybridizace 30 sekund při 60 °C
- elongace 30 sekund při 72 °C
- načítání fluorescence 5 sekund při 78 °C

Analýza křivek tání proběhla zvyšováním teploty o 0,5 °C každých 10 sekund od 55 °C do 95 °C. Specifita primerů byla ověřována pomocí křivek tání a k výpočtu exprese genu sloužil relativní model kvantifikace v porovnání s genem pro GAPDH.

6.4.4. Stanovení efektu MSC na lymfocytární populace pomocí průtokové cytometrie

Kultivace MSC s PBMC pro stanovení vlivu MSC na T lymfocyty

Ve 24jamkové destičce (TPP) bylo v celkovém objemu 1000 μ l kultivováno po dobu 72 hodin 500 μ l PBMC (z koncentrace 2×10^6 buněk/ml), 250 μ l MSC (z koncentrace od $0,2 \times 10^6$ buněk/ml – v poměru 20 : 1 a dále 40 : 1, 80 : 1, 160 : 1 a 320 : 1) a 250 μ l PHA (10 μ g/ml) (Pharmacia). Následně byly buňky převedeny do PBS a značeny pro průtokovou cytometrii. Buňky byly rozděleny na třetiny – 1/3 byla použita pro měření exprese CD25 a 2/3 byly použity pro intracelulární značení exprese transkripčních faktorů FOXP3, ROR γ t, GATA-3 a T-BET.

Měření exprese aktivačního znaku CD25 na T lymfocytech

Příslušné vzorky byly převedeny do 96jamkové destičky s kulatým dnem (Nunc) a centrifugovány (140 g, 3 minuty). Po rozvolnění buněčné pelety bylo ke vzorkům přidáno 10 μ l roztoku protilátek anti-CD4, anti-CD8 a anti-CD25 v příslušné koncentraci (Tabulka 5) a destička byla inkubována 30 minut při 4 °C.

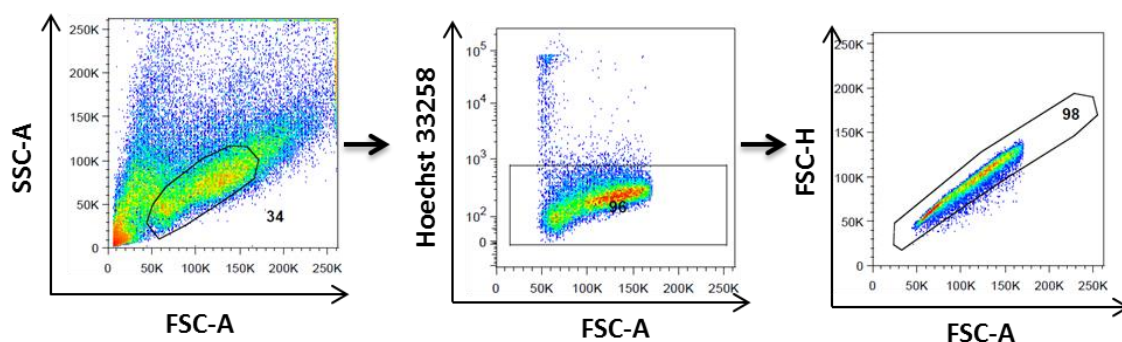
Po inkubaci byly vzorky 2krát promyty přidáním 200 μ l PBS a centrifugovány (140 g, 3 minuty). Po promytí byly vzorky naředěny v 200 μ l PBS. Za účelem označení mrtvých buněk bylo 10 minut před měřením přidáno 20 μ l Hoechst 33258 (Sigma-

Aldrich, 1 $\mu\text{g/ml}$). Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru LSRII (BD) a naměřená data byla analyzována pomocí FlowJo softwaru (LLC). Reprezentativní dot ploty znázorňující gatovací strategii buněčných událostí jsou uvedeny na Obrázku 6 a reprezentativní dot ploty ukazující gating experimentálních vzorků jsou zobrazeny na Obrázku 7.

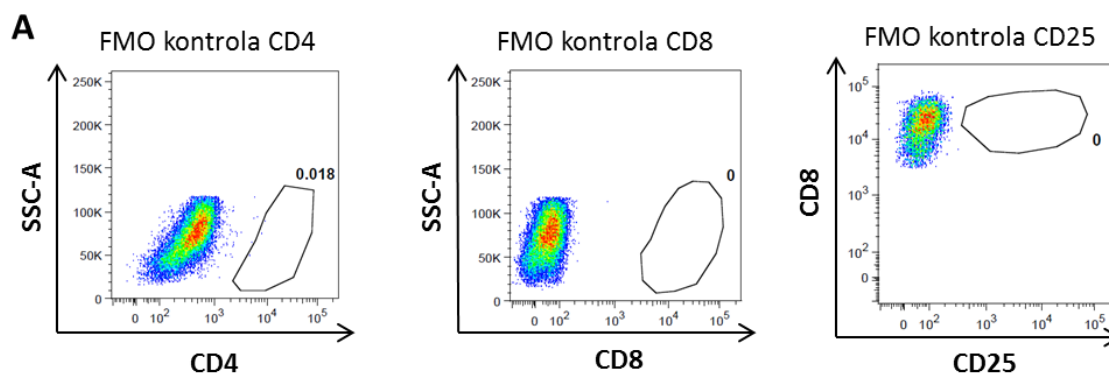
Tabulka 5: mAb použité při značení aktivace T lymfocytů

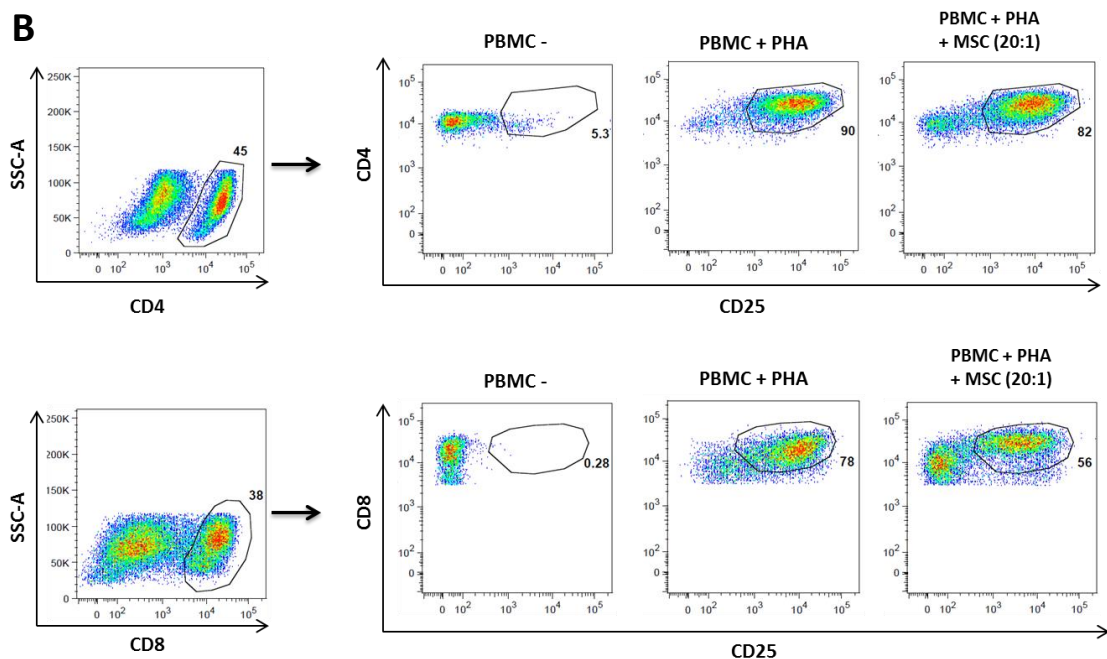
Znak	Fluorochrom	Klon protilátky	Izotyp protilátky	Reaktivita	Použitá koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Výrobce
CD25	allophycocyanin	MEM-181	myší IgG1	člověk	koncentrace neuvedena (1:20)	Exbio
CD4	FITC	RPA-T4	myší IgG1 κ	člověk	8	BioLegend
CD8a	PE	HIT8a	myší IgG1 κ	člověk	1,2	BioLegend

FITC – fluorescein isothiocyante, PE – phycoerythrin, Exbio (Praha, ČR)



Obrázek 6: Reprezentativní dot ploty ukazující základní gatovací strategii. Gating buněčných událostí, životnosti buněk a singletů.





Obrázek 7: Reprezentativní dot ploty ukazující efekt MSC na aktivaci CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů. Reprezentativní dot ploty ukazující FMO (*fluorescence minus one*) kontroly pro mAb anti-CD4, anti-CD8 a anti-CD25 (A). Reprezentativní dot ploty zobrazující gatovací strategii u vybraných vzorků nestimulovaných PBMC (PBMC-), PBMC stimulovaných PHA (PBMC PHA) a PBMC kultivovaných s MSC (v poměru 20 : 1) (B). Při analýze dat byly nejprve gatovány CD4⁺, respektive CD8⁺ buňky, aby byla z následné analýzy vyloučena případná příměs MSC. Výsledné hodnoty vyjadřují procento CD25⁺ buněk z CD4⁺, respektive CD8⁺ lymfocytů.

Studium efektu MSC na změny v procentu populací CD4⁺ lymfocytů

Buňky byly převedeny do 96jamkové destičky s kulatým dnem (Nunc) a centrifugovány (140 g, 3 minuty). Po rozvolnění buněčné pelety bylo přidáno 10 μ l roztoku anti-CD4 mAb v příslušné koncentraci (Tabulka 6) a Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kitu pro značení mrtvých buněk (ředěno 1000krát, Invitrogen, Carlsbad, CA) a inkubováno 30 minut při 4 °C. Po inkubaci byly vzorky 2krát promyty přidáním 200 μ l PBS a centrifugovány (140 g, 3 minuty).

V dalším postupu byly používány komponenty FOXP3 Staining Buffer Set - fixační/permeabilizační koncentrát, ředící roztok a permeabilizační pufr (eBioscience, San Diego, CA). Po rozvolnění buněčných pelet bylo do každé jamky přidáno 100 μ l fixačního/permeabilizačního koncentrátu (ředěného 1 : 3 v ředícím roztoku) a inkubováno při 4 °C po dobu 30 minut. Následně byly vzorky 2krát promyty přidáním 150 μ l permeabilizačního pufru (ředěný 1 : 10 v destilované vodě) a centrifugovány (140 g, 3 minuty).

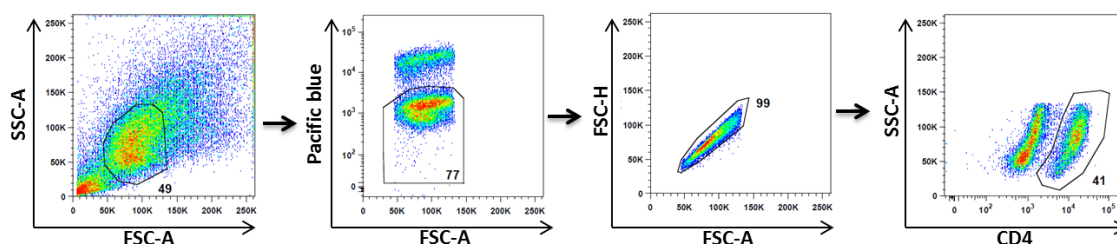
Následně bylo do každé jamky přidáno 10 μ l roztoku mAb anti-FOXP3 a anti-ROR γ t nebo roztoku mAb anti-GATA-3 a anti-T-BET (v příslušné koncentraci dle

Tabulky 6) a inkubováno 30 minut při 4 °C. Pelety byly 2krát promyty přidáním 150 µl roztoku permeabilizačního pufru (ředěný 1 : 10 v destilované vodě) a centrifugovány (140 g, 3 minuty). Rozvolněné buněčné pelety byly rozředěny ve 200 µl permeabilizačního pufru, vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru LSRII (BD). Naměřená data byla analyzována pomocí FlowJo softwaru (LLC). Reprezentativní dot ploty znázorňující gatovací strategii buněčných událostí jsou ukázány na Obrázku 8. Reprezentativní dot ploty ukazující gatovací strategii na experimentálních vzorcích včetně kontrolních vzorků jsou uvedeny na Obrázku 9.

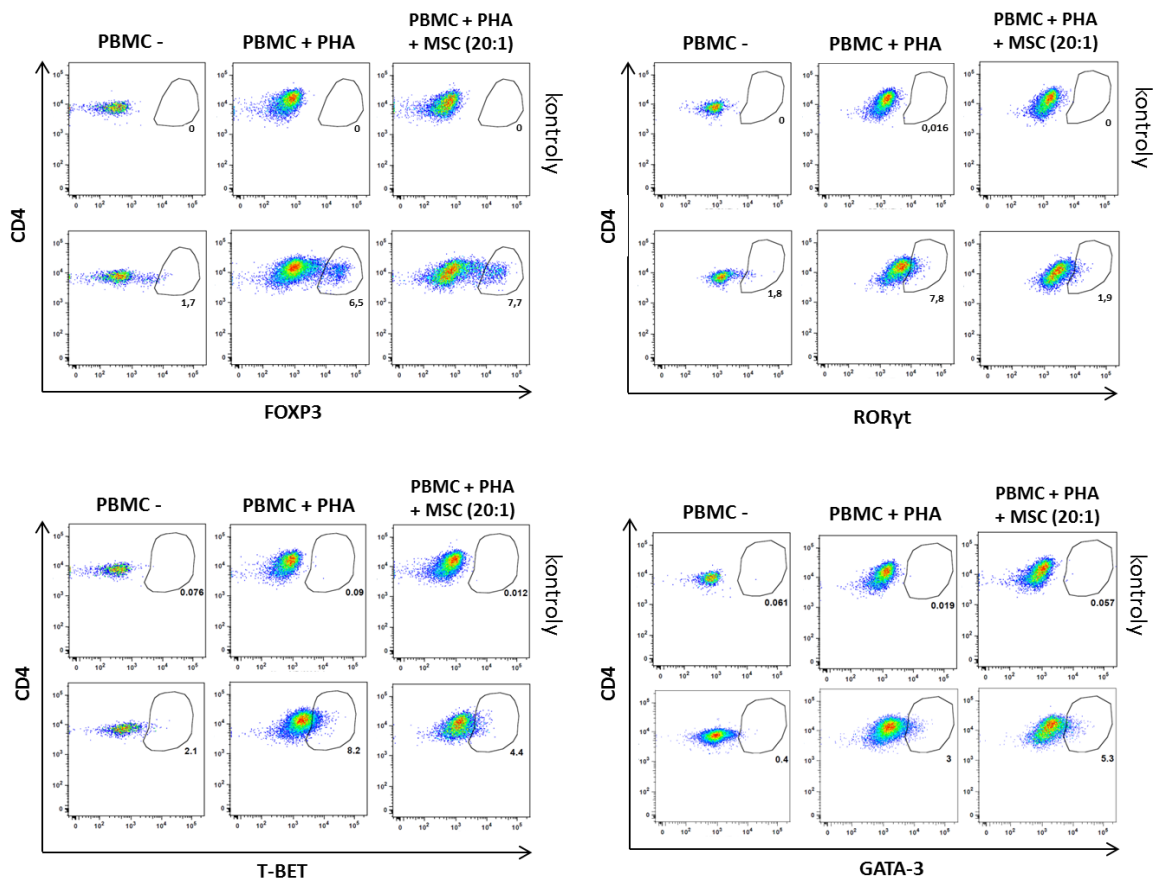
Tabulka 6: mAb použité při značení transkripčních faktorů CD4⁺ T lymfocytů

Znak	Fluorochrom	Klon protilátky	Izotyp protilátky	Reaktivita	Použitá koncentrace (µg/ml)	Výrobce
CD4	FITC	RPA-T4	myši IgG1 κ	člověk	8	BioLegend
FOXP3	Alexa Fluor 647	150D	myši IgG1 κ	člověk/myš/ potkan	1,4	BioLegend
CD90.1	Alexa Fluor 647	OX-7	myši IgG1 κ	myš/potkan	1,4	BioLegend
RORγt	PE	AFKJS-9	potkaní IgG2a	člověk/myš	5	eBioscience
CD105	PE	MJ7/18	potkaní IgG2a	myš	5	eBioscience
GATA-3	PE	TWAJ	potkaní IgG2b κ	člověk/myš	1,2	eBioscience
CD4	PE	GK1.5	potkaní IgG2b κ	myš	1,2	BioLegend
T-BET	Alexa Fluor 647	4B10	myši IgG1 κ	člověk/myš	7,1	BioLegend
CD90.1	Alexa Fluor 647	OX-7	myši IgG1 κ	myš/potkan	7,1	BioLegend

FITC – fluorescein isothiocyanate, PE – phycoerythrin. Fialově jsou označeny protilátky reagující proti myším antigenům použité jako kontrola pro gating intracelulárního značení transkripčních faktorů FOXP3, RORγt, GATA-3 a T-BET.



Obrázek 8: Reprezentativní dot ploty ukazující základní gatovací strategii buněčných událostí. Gating buněčných událostí, životnosti (Pacific blue), singletů a znaku CD4.



Obrázek 9: Reprezentativní dot ploty ukazující efekt MSC na subpopulace CD4⁺ T lymfocytů. Reprezentativní dot ploty znázorňují gatovací strategii značení transkripčních faktorů FOXP3, ROR γ t, T-BET a GATA-3. Při analýze dat byly nejprve gatovány CD4⁺ buňky a následně příslušné transkripční faktory s ohledem na kontrolní vzorky, při jejichž značení byl použit stejný postup s tím rozdílem, že mAb proti danému transkripčnímu faktoru byla nahrazena mAb proti myším antigenům – viz Tabulka 6).

6.5. Statistická analýza

Pro vyhodnocení dat byl využit software Microsoft Excel a GraphPad Prism 5. Pro srovnání dvou skupin byla signifikance stanovena pomocí t-testu, srovnání více skupin s různým poměrem PBMC : MSC bylo provedeno dvoufaktorovým testem ANOVA s opakováním. Srovnání efektu jedné skupiny k referenční hodnotě bylo provedeno jednofaktorovým testem ANOVA s následným Dunnettovým testem. Zobrazené hodnoty v grafech reprezentují aritmetický průměr naměřených hodnot se směrodatnou odchylkou (SD, *standard deviation*). Pro označení signifikantního rozdílu mezi MSC z kontrolní (KON) a ALS skupiny (ALS) byl použit symbol * a pro označení rozdílu mezi MSC ovlivněnými cytokiny z kontrolní (KONc) a ALS (ALS_c) skupiny byl použit symbol †. Za signifikantní byly považovány hodnoty * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$.

Výsledky

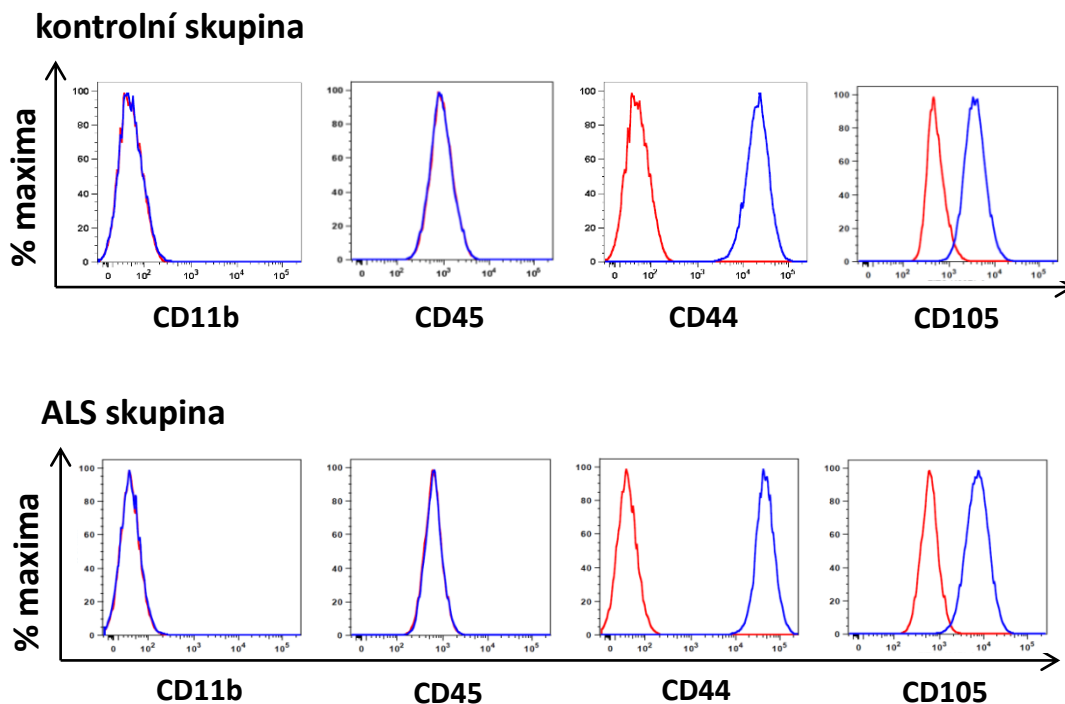
V této práci byly testovány fenotypové a funkční vlastnosti MSC získaných z kostní dřeně pacientů s ALS (v následujícím textu označováno jako ALS skupina) a dále MSC z kostní dřeně pacientů podstupujících převážně ortopedické operace (v následujícím textu označováno jako kontrolní skupina). Každé MSC byly dále testovány neovlivněné nebo stimulované prozánětlivými cytokiny TNF- α , IFN- γ a IL-6 po dobu 24 hodin. Získaná data byla pro vyhodnocení výsledků rozdělena do čtyř skupin. MSC z kontrolní skupiny jsou označovány v grafech jako „KON“, po ovlivnění cytokiny jako „KONc“. MSC z ALS skupiny jsou v grafech označovány jako „ALS“ a po ovlivnění prozánětlivými cytokiny jako „ALSc“. Toto značení je používáno v celém souboru výsledků. Statisticky významný rozdíl mezi KON a ALS je v grafech označován symbolem * a statisticky významný rozdíl mezi KONc a ALSc je označován symbolem †. Výsledky vedlejších statistických analýz (hodnocení statistické významnosti efektu MSC na PBMC ve srovnání se stimulovanými PBMC bez přítomnosti MSC a vliv cytokinů na efekty MSC) nejsou vyznačeny v grafech, ale pouze komentovány v textu.

7. Charakterizace MSC

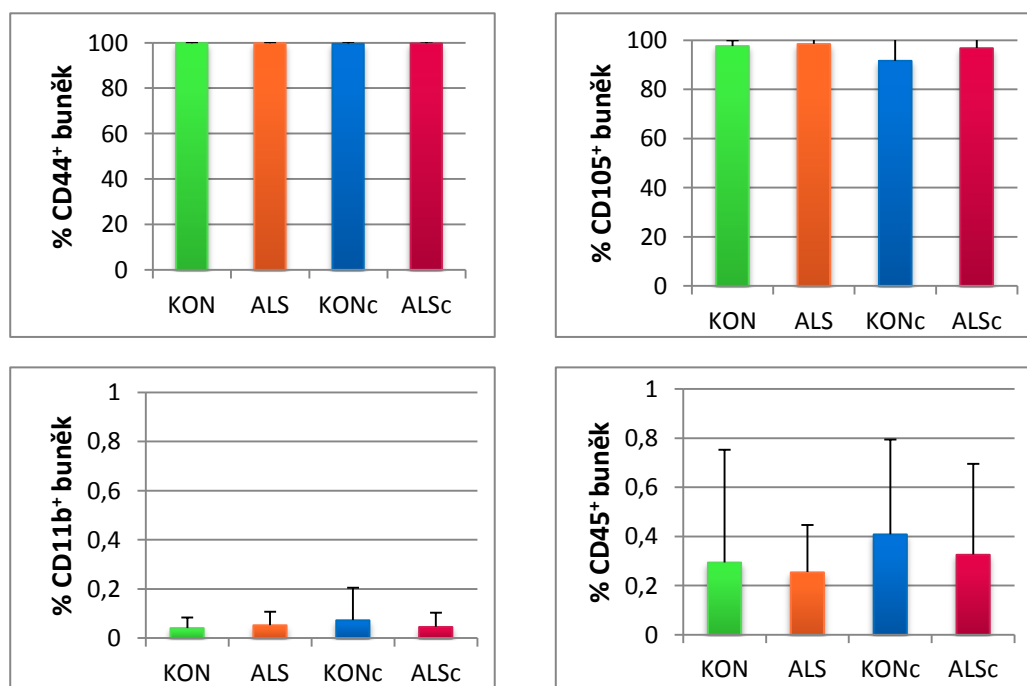
Před porovnáváním funkčních vlastností MSC bylo třeba ověřit, že se testované buňky neliší v základních charakteristikách včetně metabolické aktivity a exprese povrchových znaků. Případné statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve funkčních testech tak mohly být považovány za efekt působení MSC a ne za důsledek fenotypové nebo metabolické rozdílnosti mezi skupinami.

7.1. Fenotyp MSC

MSC byly charakterizovány průtokovou cytometrií, pomocí které byla experimentálně ověřena exprese povrchových znaků CD44 a CD105 a naopak absence leukocytárních znaků CD11b a CD45 (Obrázek 10). V rámci testovaných skupin nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v procentu CD44⁺ a CD105⁺ buněk (> 95 %) a ani v procentu CD11b⁺ a CD45⁺ buněk (< 2 %) (Obrázek 11). Testované MSC vykazují standardní fenotyp bez statisticky významných odlišností mezi skupinami (stanoveno t-testem).



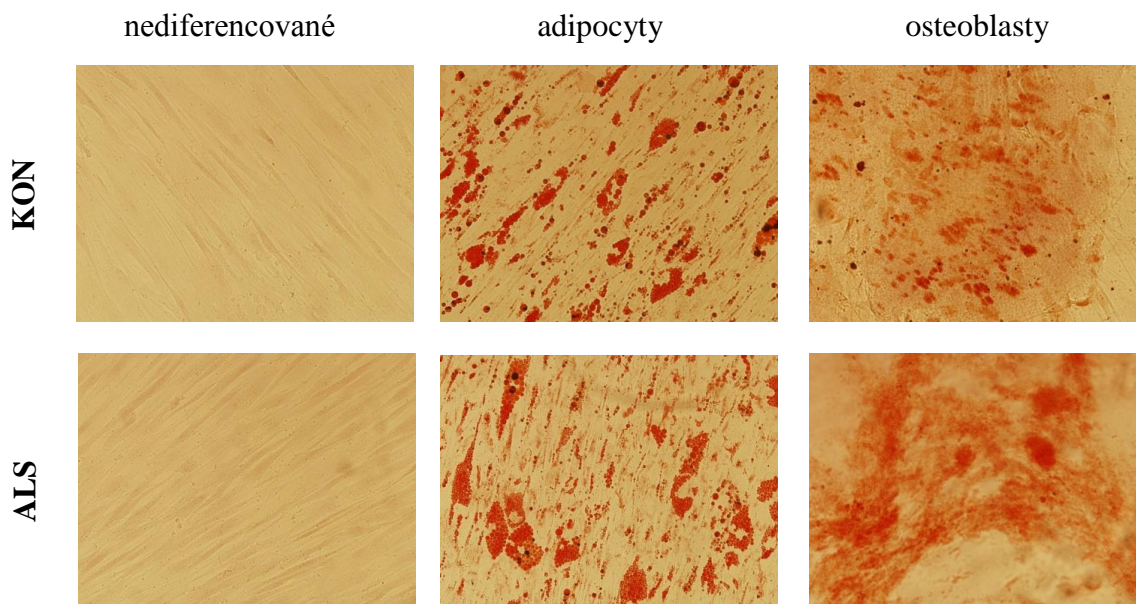
Obrázek 10: Fenotyp MSC – reprezentativní histogramy. Reprezentativní histogramy ukazující expresi vybraných znaků u kontrolní skupiny a ALS skupiny. Červená křivka představuje neznačené MSC, modrá MSC značené příslušnou mAb.



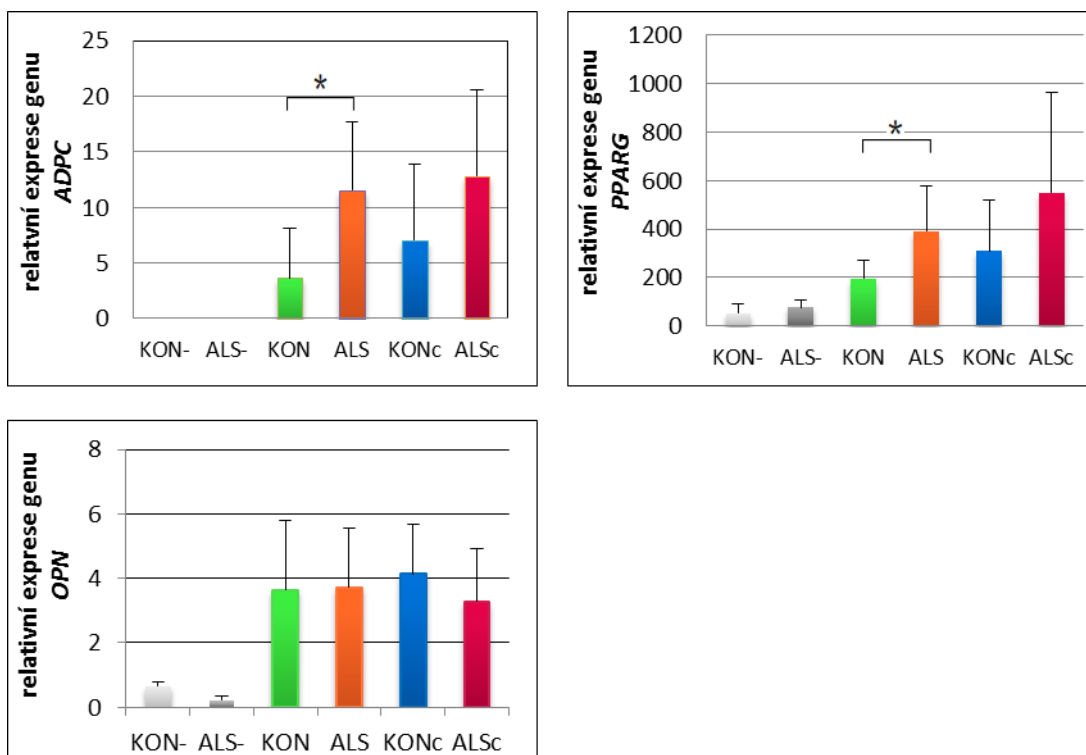
Obrázek 11: Fenotyp MSC. Metodou průtokové cytometrie bylo stanoveno procento CD44⁺, CD105⁺, CD11b⁺ a CD45⁺ buněk. V tomto experimentu byl porovnáván fenotyp MSC kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý sloupec představuje průměr + SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

7.2. Diferenciace MSC

Pro ověření a porovnání diferenciačního potenciálu MSC byly buňky stimulovány indukčními činidly po dobu 14 dnů pro adipogenní diferenciaci a po dobu 21 dnů pro osteogenní diferenciaci. Diferenciační potenciál MSC byl ověřen mikroskopicky (Obrázek 12) a dále byla metodou real-time PCR testována exprese genů typických pro adipogenní diferenciaci (*PPARG* a *ADPC*) a osteogenní diferenciaci (*OPN*) (Obrázek 13). Pomocí mikroskopické analýzy byla potvrzena schopnost diferenciace MSC u porovnávaných skupin. Kvantifikací diferenciace pomocí real-time PCR byla ukázána signifikantně vyšší míra adipogenní diferenciace u MSC z ALS skupiny. Tyto výsledky byly navíc potvrzeny i další metodou, v níž bylo z obarvených vzorků pomocí izopropanolové eluce uvolňováno Oil Red O a intenzita zabarvení byla stanovena spektrofotometricky (výsledky nejsou ukázány).



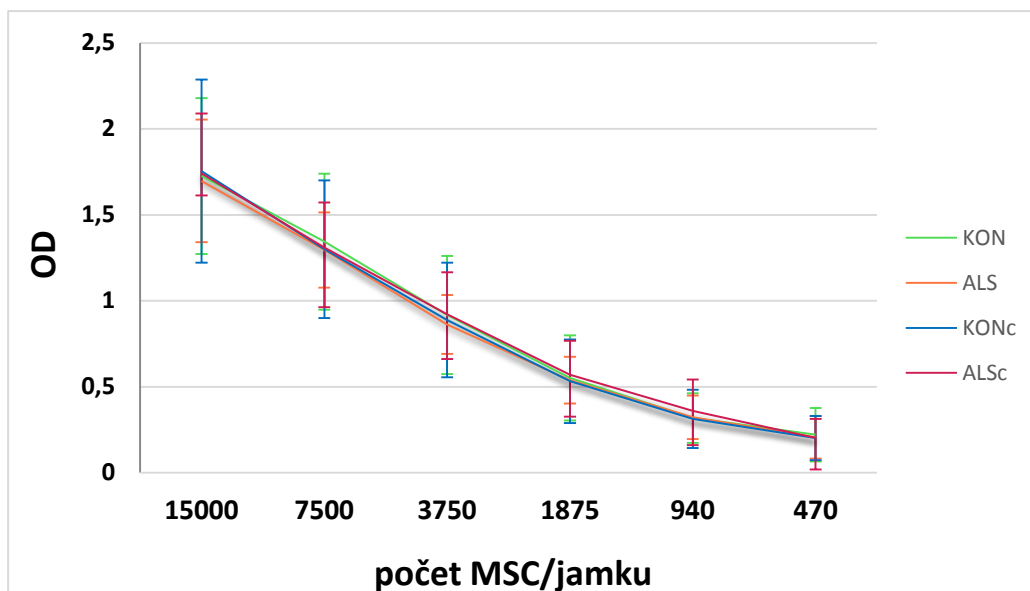
Obrázek 12: Diferenciace MSC v adipocyty a osteoblasty. Adipogenní diferenciace byla ověřena barvením tukových vakuol pomocí Oil Red O a osteogenní diferenciace byla ověřena barvením kalciových depozitů pomocí Alizarin Red. Obrázky znázorňují reprezentativní mikroskopické snímky MSC z kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS). Zvětšení 200x.



Obrázek 13 : Expresse genů charakteristických pro adipocyty a osteoblasty. Metodou real-time PCR byla stanovena relativní exprese genů *ADPC*, *PPARG* a *OPN*. Genová exprese byla měřena u nediferencovaných MSC (KON- a ALS-), MSC z kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý sloupec představuje průměr + SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc). * znázorňuje signifikantní rozdíl mezi ALS a KON. Za signifikantní byly považovány hodnoty * $p < 0,05$.

7.3. Metabolická aktivita MSC

Stanovení metabolické aktivity MSC pomocí WST-1 bylo důležité pro následnou porovnatelnost výsledků z funkčních testů. MSC byly kultivovány 48 hodin v různých koncentracích a po přidání činidla WST-1 a inkubaci byla měřena výsledná změna zabarvení pomocí spektrofotometru. Metabolická aktivita byla u všech čtyř skupin srovnatelná a jednofaktorový test ANOVA prokázal, že rozdíly u všech koncentrací MSC nejsou signifikantní (Obrázek 14).

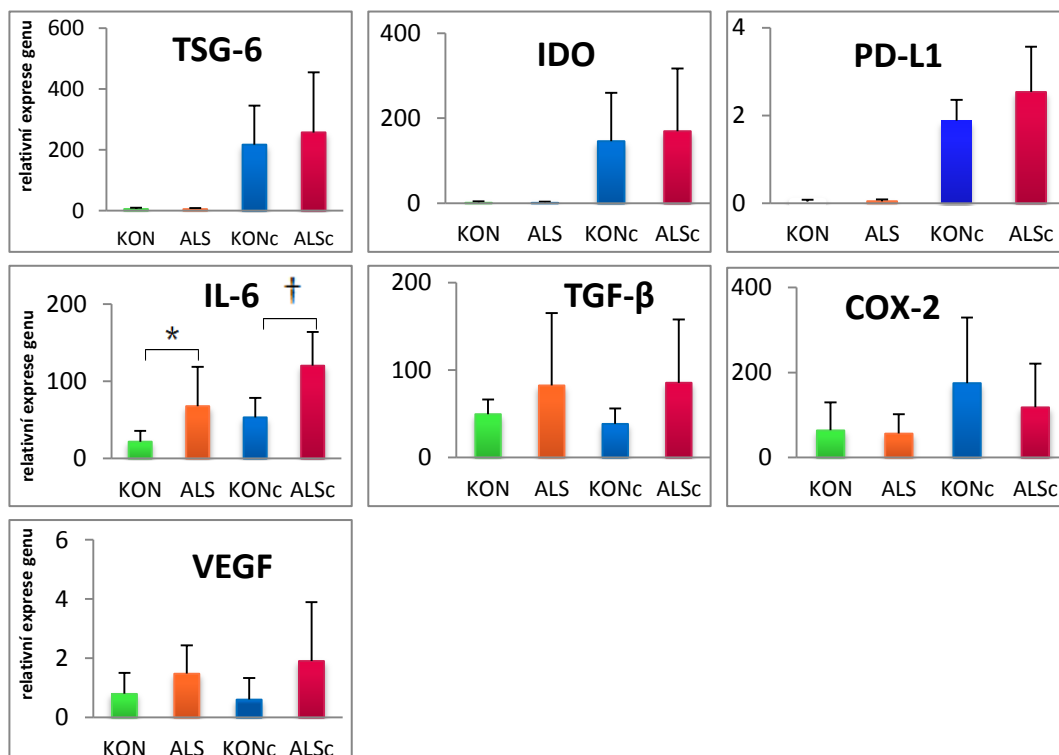


Obrázek 14: Stanovení metabolické aktivity MSC. Metabolická aktivita byla měřena pomocí WST-1 u MSC kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

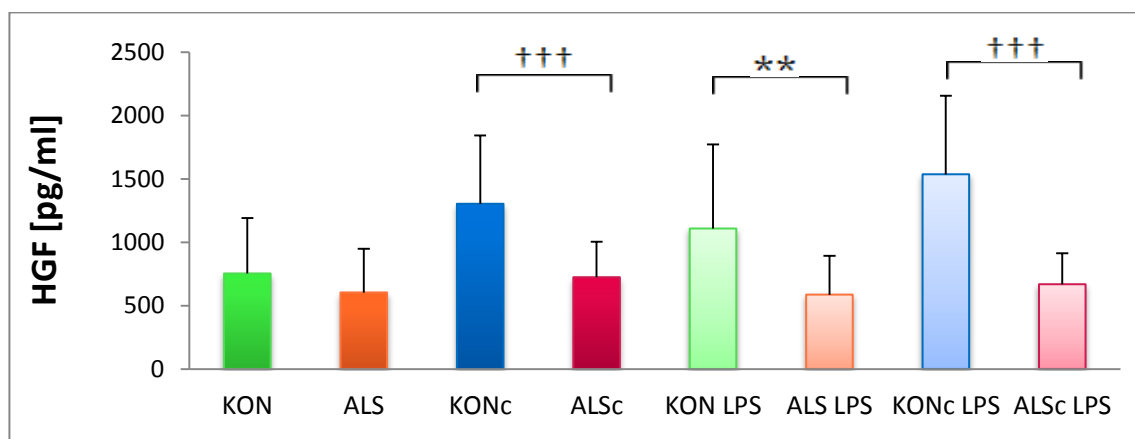
7.4. Produkce a exprese genů pro imunomodulační molekuly MSC

Expres genů pro imunomodulační molekuly a produkce těchto faktorů je klíčovým mechanismem působení MSC. Metodou real-time PCR byla stanovena exprese genů pro vybrané imunomodulační molekuly (Obrázek 15) a výsledky byly doplněny metodou ELISA, kterou bylo detekováno množství produkovaného HGF po 48 hodinách kultivace MSC (Obrázek 16). Mezi ALS a kontrolní skupinou byl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi genu pro IL-6, přičemž MSC z ALS skupiny vykazovaly signifikantně vyšší expresi než MSC z kontrolní skupiny. Naproti tomu, MSC z kontrolní skupiny produkovaly po ovlivnění prozánětlivými cytokiny nebo LPS signifikantně vyšší množství HGF než stejně ovlivněné MSC z ALS skupiny.

Při sledování vlivu cytokinů na expresi genů pro imunomodulační molekuly bylo zjištěno, že MSC z ALS i kontrolní skupiny inducibilně exprimovaly gen *TSG-6*, *IDO* a *PD-L1*. Prozánětlivé cytokiny rovněž signifikantně zvyšovaly expresi *IL-6* u ALS i kontrolní skupiny. V ostatních případech nebylo zvýšení exprese genů pro imunomodulační molekuly po ovlivnění prozánětlivými cytokiny statisticky významné. V případě efektu cytokinů na produkci HGF bylo zjištěno signifikantní zvýšení produkce u MSC z kontrolní skupiny bez LPS i v jeho přítomnosti. Výsledky statistické analýzy vlivu cytokinů nejsou v grafech vyznačeny.



Obrázek 15: Expres genů pro vybrané imunomodulační molekuly MSC. Metodou real-time PCR byla stanovena relativní exprese genů pro TSG-6, IDO, PD-L1, IL-6, TGF-β, COX-2 a VEGF. Genová exprese byla měřena u MSC kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý sloupec představuje průměr + SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc). * znázorňuje signifikantní rozdíl mezi ALS a KON; † znázorňuje signifikantní rozdíl mezi ALSc a KONc. Za signifikantní byly považovány hodnoty * $p < 0,05$, † $p < 0,05$.

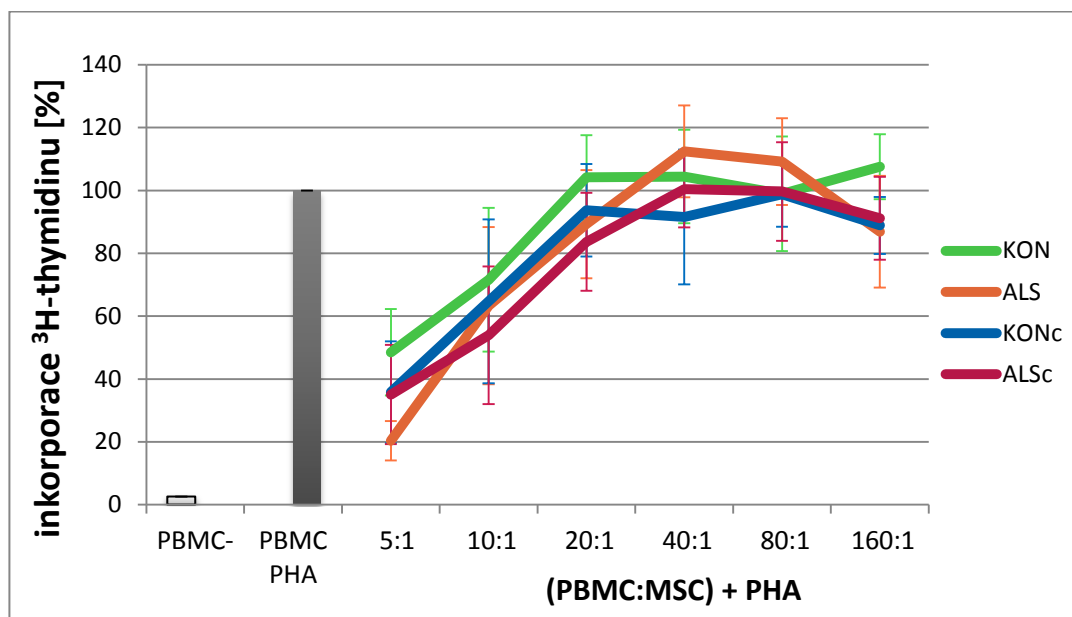


Obrázek 16: Produkce HGF MSC. Koncentrace HGF byla stanovena metodou ELISA v supernatanech z MSC kultivovaných po dobu 48 hodin bez ovlivnění nebo s LPS. Produkce HGF byla měřena u MSC kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý sloupec představuje průměr + SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc). * znázorňuje signifikantní rozdíl mezi ALS a KON; † znázorňuje signifikantní rozdíl mezi ALSc a KONc. Za signifikantní byly považovány hodnoty ** $p < 0,01$ a ††† $p < 0,001$.

8. Funkční testy MSC

8.1. Inhibice proliferace PBMC

Pro stanovení vhodného poměru PBMC a MSC pro následné funkční testy byl sledován efekt různých koncentrací MSC na proliferaci PBMC stimulovaných PHA. Proliferace stimulovaných PBMC byla stanovena měřením inkorporace ^3H -thymidinu. Data byla vzhledem k velkému rozptylu hodnot normalizována a jako referenční hodnota byly použity PBMC stimulované PHA (PBMC PHA = 100 %) (Obrázek 17). Pomocí testu ANOVA nebyl mezi efektem MSC z jednotlivých skupin zjištěn signifikantní rozdíl. Pro další funkční testy byl vybrán počáteční poměr mezi PBMC a MSC 20 : 1, protože při tomto a následujících ředěních již nedocházelo k statisticky významnému inhibičnímu efektu MSC na proliferaci PBMC (stanoveno Dunnettovým testem, tato statistická analýza není na Obrázku 17 znázorněna).

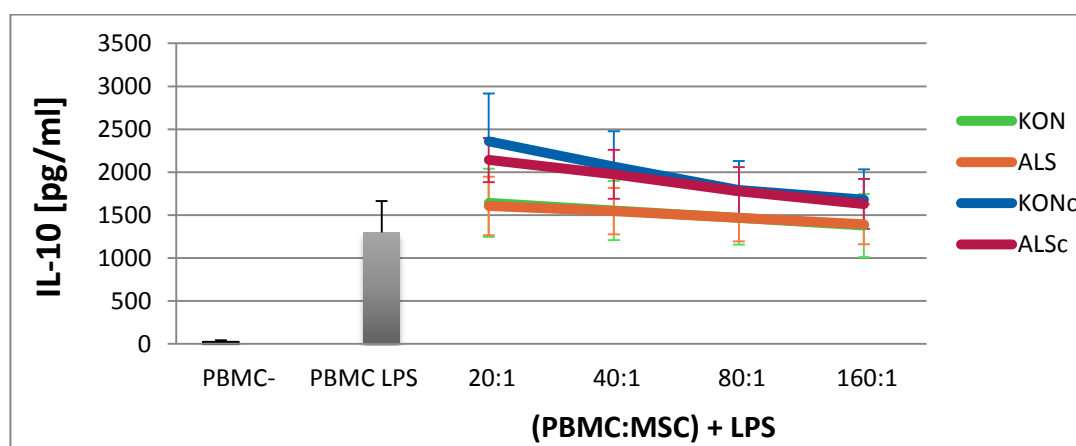


Obrázek 17: Inhibiční efekt MSC na proliferaci PBMC. Po dobu 72 hodin byly kultivovány PBMC bez simulace (PBMC-), stimulované PHA (PBMC PHA) a PBMC s MSC v různých poměrech (5 : 1 až 160 : 1) v přítomnosti PHA. Inhibiční efekt byl sledován u MSC kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Proliferace byla měřena na základě inkorporace ^3H -thymidinu. Data byla normalizována a jako referenční hodnota byly použity PBMC stimulované PHA (PBMC PHA = 100 %). Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

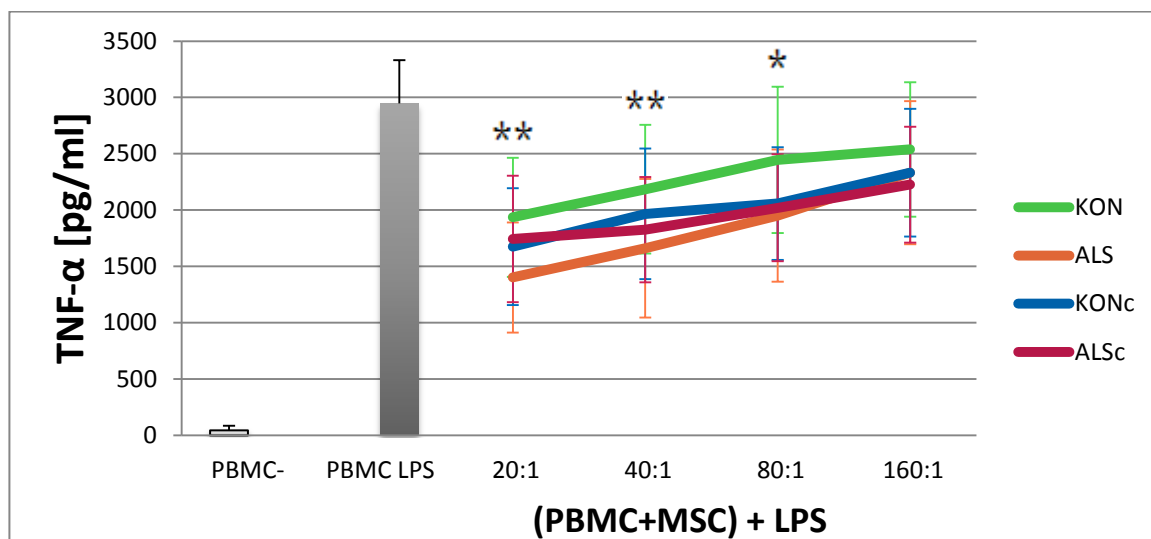
8.2. Vliv MSC na buňky přirozené imunity

Některé práce prokázaly, že se buňky přirozené imunity částečně podílí na patogenezi ALS a tudíž může být potlačení jejich efektorových mechanismů jedním z možných terapeutických účinků MSC. Metodou ELISA byl stanoven vliv MSC na produkci vybraných cytokinů u PBMC stimulovaných LPS a bylo zjištěno posílení produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 (Obrázek 18) a naopak snížení produkce prozánětlivého cytokinu TNF- α (Obrázek 19). Statistická významnost byla hodnocena t-testy. V případě efektu na produkci IL-10 nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi ALS a kontrolní skupinou. MSC z kontrolní i ALS skupiny ovlivněné cytokiny signifikantně zvyšovaly produkci IL-10 ($p < 0,001$ pro všechna ředění u obou skupin).

V poměrech 20 : 1, 40 : 1 a 80 : 1 byl zjištěn signifikantní rozdíl v potlačení produkce TNF- α mezi kontrolní a ALS skupinou, přičemž MSC z ALS skupiny potlačovaly tuto produkci výrazněji. U MSC ovlivněných prozánětlivými cytokiny byly naproti tomu efekty kontrolní skupiny (KONc) srovnatelné se skupinou ALS (ALSc), protože stimulace cytokiny u MSC z ALS skupiny v tomto případě nevedla ke zvýšení inhibičních schopností. Výsledky tohoto experimentu naznačují, že by buňky od pacientů s ALS mohly být prestimulovány již v organismu vlivem probíhajícího onemocnění, což by vysvětlovalo, proč MSC z ALS skupiny inhibovaly produkci TNF- α srovnatelně jako MSC ovlivněné cytokiny z kontrolní a ALS skupiny.



Obrázek 18: Vliv MSC na produkci IL-10 u PBMC. Koncentrace IL-10 byla stanovena v supernatantech z PBMC bez stimulace (PBMC-), stimulovaných LPS (PBMC LPS) a PBMC kulturovaných s MSC v různém poměru v přítomnosti LPS. Efekt na produkci IL-10 byl měřen u MSC z kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).



Obrázek 19: Efekt MSC na produkci TNF- α u PBMC. Koncentrace TNF- α byla stanovena v supernatantech z PBMC bez stimulace (PBMC-), stimulovaných LPS (PBMC LPS) a PBMC kultivovaných s MSC v různém poměru v přítomnosti LPS. Efekt na produkci TNF- α byl měřen u MSC kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc). * znázorňuje signifikantní rozdíl mezi ALS a KON. Za signifikantní byly považovány hodnoty * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$.

8.3. Stanovení vlivu MSC na aktivaci T lymfocytů

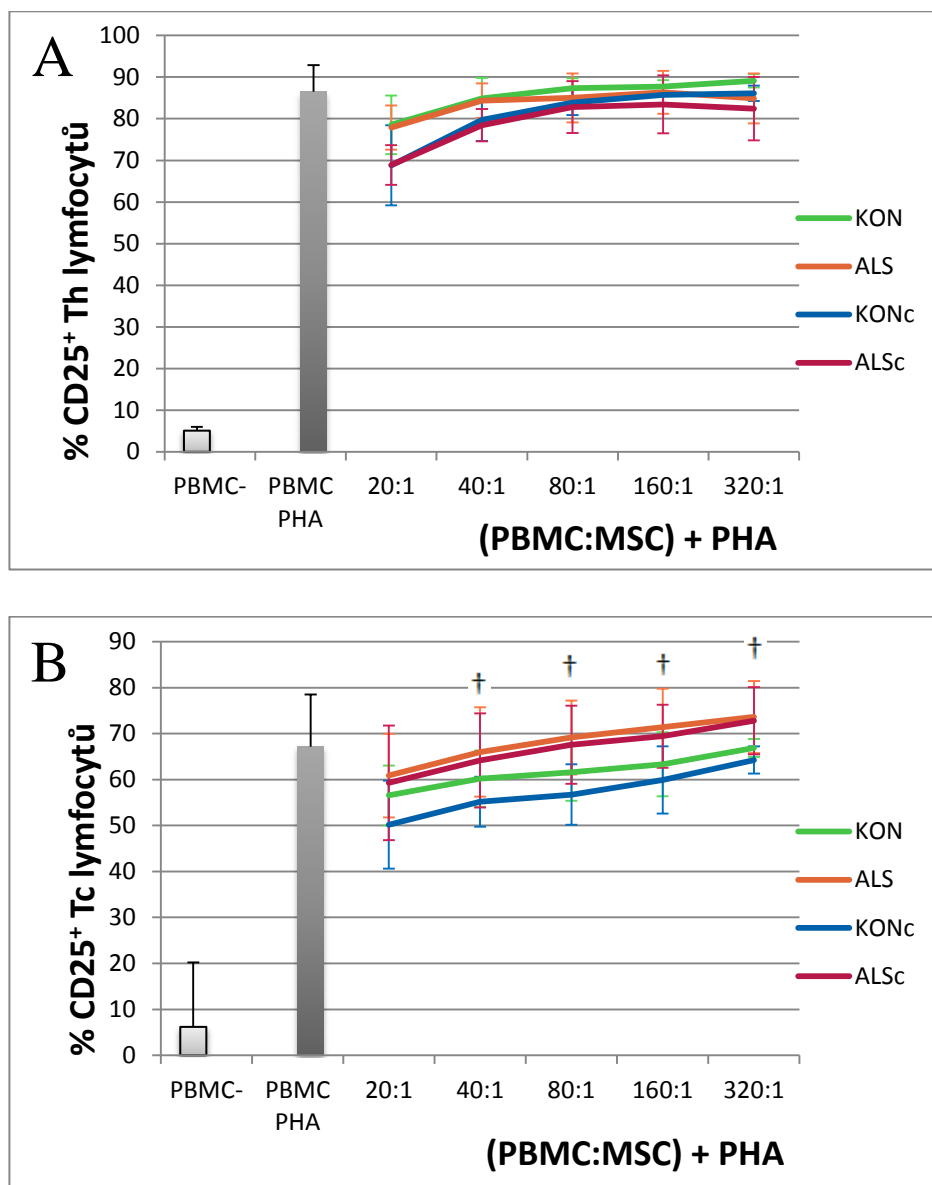
Molekula CD25 je α -podjednotkou receptoru pro IL-2 a představuje jeden z aktivačních znaků T lymfocytů. Bylo prokázáno, že MSC mohou ovlivňovat aktivaci T lymfocytů stimulovaných PHA a potlačovat u nich expresi aktivačních znaků CD25 a CD38. Na základě těchto výsledků jsme ověřovali, zda jsou MSC získané od pacientů s ALS schopny potlačovat expresi CD25 u Th a Tc lymfocytů se srovnatelnou účinností jako MSC z kontrolní skupiny.

V tomto experimentu byly kultivovány PBMC s MSC v různých poměrech (od 20 : 1 po 320 : 1) v přítomnosti PHA po dobu 72 hodin. Následně byly buňky označeny pomocí mAb anti-CD4, anti-CD8 a anti-CD25 a měřeny na průtokovém cytometru. Gatovací strategie je ukázána na Obrázku 7 v metodické části. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento CD25⁺ buněk z CD4⁺ nebo CD8⁺ T lymfocytů.

MSC z kontrolní i ALS skupiny snižovaly procento CD25⁺ Th lymfocytů pouze v nejvyšší koncentraci (20 : 1), MSC z kontrolní i ALS skupiny stimulované cytokiny snižovaly procento CD25⁺ Th lymfocytů statisticky významněji než nestimulované MSC (Obrázek 20A). Naproti tomu, v případě snížení procenta CD25⁺ Tc lymfocytů byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi účinkem MSC stimulovaných cytokiny z kontrolní a ALS skupiny, přičemž MSC z kontrolní skupiny snižovaly podíl CD25⁺ Tc

lymfocytů výrazněji (Obrázek 20B). Obdobný rozdíl mezi MSC z kontrolní a ALS skupiny je patrný i u nestimulovaných MSC.

V případě snížení procenta $CD25^+$ Tc lymfocytů oproti kontrolním PBMC stimulovaným PHA byly MSC z ALS skupiny účinné pouze v poměru 20 : 1, naproti tomu MSC z kontrolní skupiny až do poměru 160 : 1.



Obrázek 20: Vliv MSC na podíl aktivovaných $CD25^+$ Th a Tc lymfocytů. Po dobu 72 hodin byly kultivovány v různých poměrech (20 : 1, 40 : 1, 80 : 1, 160 : 1 a 320 : 1) PBMC stimulované PHA s MSC z kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a MSC s stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc). Procento $CD25^+$ buněk z $CD4^+$ (A) a $CD8^+$ (B) lymfocytů bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) nebo 15 vzorků (KON a KONc). † označuje signifikantní rozdíl mezi ALSc a KONc ($p < 0,05$).

8.4. Vliv MSC na subpopulace CD4⁺ T lymfocytů

Přítomnost buněk adaptivní imunity a především T lymfocytů byla prokázána v místech probíhajícího zánětu v míše experimentálních zvířat i v histologických preparátech pacientů s ALS. Zdá se, že se patogeneze onemocnění účastní především Th lymfocyty a tudíž ovlivnění rovnováhy mezi populacemi Th lymfocytů by mohlo přispět ke zpomalení progresu ALS.

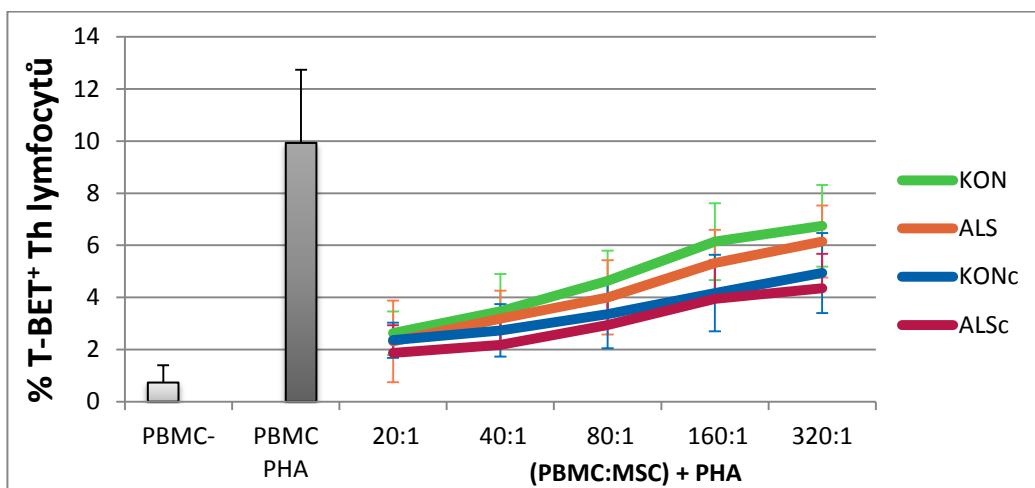
Při analýze dat z průtokové cytometrie byly nejprve gatovány CD4⁺ buňky, abychom z následné analýzy vyloučili případnou příměs MSC, jejichž část se při sběru vzorků mohla uvolnit spolu s PBMC. V metodické části jsou zařazeny Obrázky 8 a 9 ukazující reprezentativní dot ploty znázorňující gatovací strategii včetně gatingu kontrolních vzorků. Pro ověření výsledků efektu MSC na procento RORγt⁺, GATA-3⁺ a T-BET⁺ Th lymfocytů byla data navíc analyzována i na základě vynesení střední intenzity fluorescence (výsledky nejsou ukázány).

8.4.1. Vliv MSC na vývoj a funkce Th1 lymfocytů

Th1 lymfocyty produkují mimo jiné prozánětlivý cytokin IFN-γ, který aktivuje makrofágy a přispívá k rozvoji zánětu. V progredující fázi ALS dochází k posunu rovnováhy Th lymfocytů směrem k Th1, což přispívá k dalšímu rozvoji neurotoxické odpovědi způsobující odumírání motoneuronů. Bylo popsáno, že MSC inhibují vývoj i efektorové mechanismy Th1 lymfocytů a potlačují rozvoj nežádoucího zánětu, což by u ALS mohlo vést ke zpomalení progresu onemocnění.

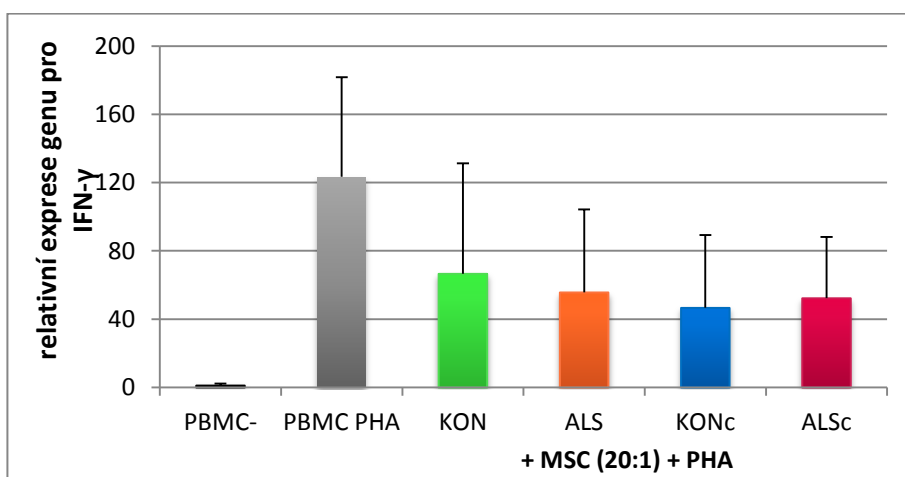
PBMC byly kultivovány s MSC v různých poměrech (od 20 : 1 po 320 : 1) v přítomnosti PHA po dobu 72 hodin. Následně byly buňky označeny pomocí mAb anti-CD4, fixovány a permeabilizovány, označeny protilátkou proti transkripčnímu faktoru Th1 lymfocytů T-BET a měřeny na průtokovém cytometru. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento T-BET⁺ buněk z CD4⁺ T lymfocytů (Obrázek 21). Gatovací strategie je ukázána na Obrázku 9 v metodické části.

MSC signifikantně snižovaly procento T-BET⁺ lymfocytů ve všech poměrech PBMC : MSC (stanoveno Dunnettovým testem, $p < 0,001$). Porovnání efektu MSC z ALS a kontrolní skupiny bylo provedeno t-testy a neukázalo signifikantní odlišnosti. Výraznější snížení procenta T-BET⁺ Th lymfocytů bylo pozorováno u MSC ovlivněných prozánětlivými cytokiny.



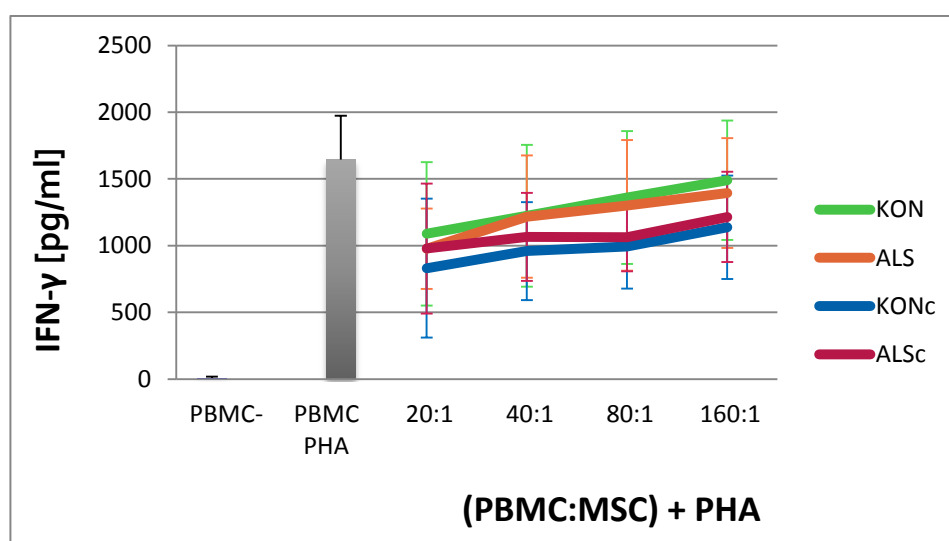
Obrázek 21: Vliv MSC na procento T-BET⁺ Th lymfocytů. PBMC stimulované PHA byly kultivovány s MSC z kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a MSC s stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc) po dobu 72 hodin. Procento T-BET⁺ buněk z CD4⁺ T lymfocytů bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. Každý bod představuje průměr ± SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) nebo 15 vzorků (KON a KONc).

Vliv MSC na změny v expresi genu pro IFN- γ u PBMC stimulovaných PHA byl stanoven metodou real-time PCR. PBMC stimulované PHA byly kultivovány s MSC v poměru 20 : 1 po dobu 48 hodin. MSC z kontrolní i ALS skupiny účinně inhibovaly expresi genu pro IFN- γ u PBMC stimulovaných PHA (Obrázek 22). Statistickou analýzou nebyla prokázána signifikantní odlišnost mezi kontrolní a ALS skupinou.



Obrázek 22: Vliv MSC na expresi genu pro IFN- γ u T lymfocytů. Metodou real-time PCR byla stanovena relativní exprese genu pro IFN- γ . Genová exprese byla měřena u PBMC stimulovaných PHA, které byly kultivované s MSC z kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a s MSC stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc). Každý sloupec představuje průměr ± SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

Metodou ELISA byl u PBMC stanoven vliv MSC na produkci IFN- γ . PBMC byly stimulovány PHA a kultivovány s MSC v různých poměrech (od 20 : 1 po 160 : 1) po dobu 48 hodin (Obrázek 23). Získaná data byla statisticky zhodnocena dvoufaktorovým testem ANOVA s opakováním, který neprokázal signifikantní rozdíly v potlačení produkce IFN- γ mezi MSC z kontrolní a ALS skupiny. Vliv cytokinů byl hodnocen t-testem a prokázal signifikantně vyšší inhibici produkce IFN- γ při ovlivnění MSC prozánětlivými cytokiny v poměrech 40 : 1, 80 : 1 a 160 : 1 u kontrolní skupiny a 80 : 1 a 160 : 1 u ALS skupiny.



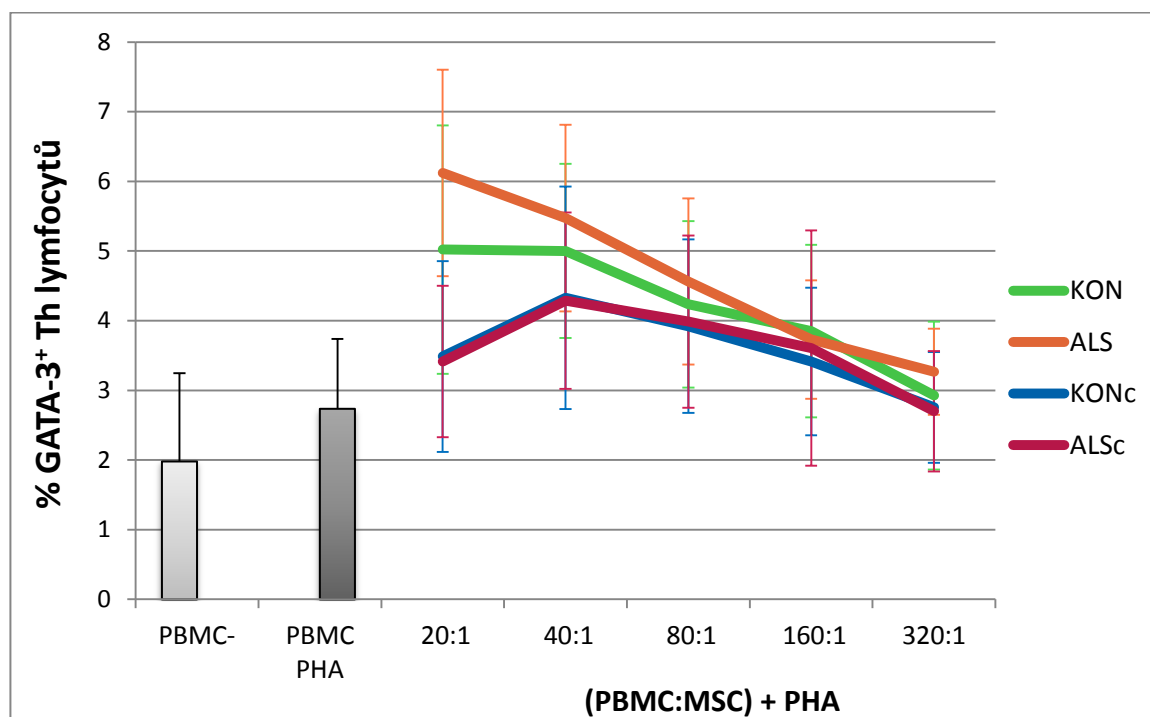
Obrázek 23: Vliv MSC na produkci IFN- γ T lymfocyty. Koncentrace IFN- γ byla stanovena v supernatantech z PBMC stimulovaných PHA, které byly kultivované s MSC v různém poměru po dobu 48 hodin. Efekt na produkci IFN- γ byl měřen u MSC z kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

8.4.2. Vliv na MSC vývoj a funkce Th2 lymfocytů

Th2 lymfocyty produkují celou řadu cytokinů včetně IL-4 a IL-10 podporujících protizánětlivý typ imunitní odpovědi. Th2 lymfocyty převažují v časné pomalu progredující fázi ALS a změna rovnováhy Th lymfocytů v jejich prospěch by mohla oddálit nástup agresivní fáze ALS spojené s rapidním zhoršením stavu pacienta.

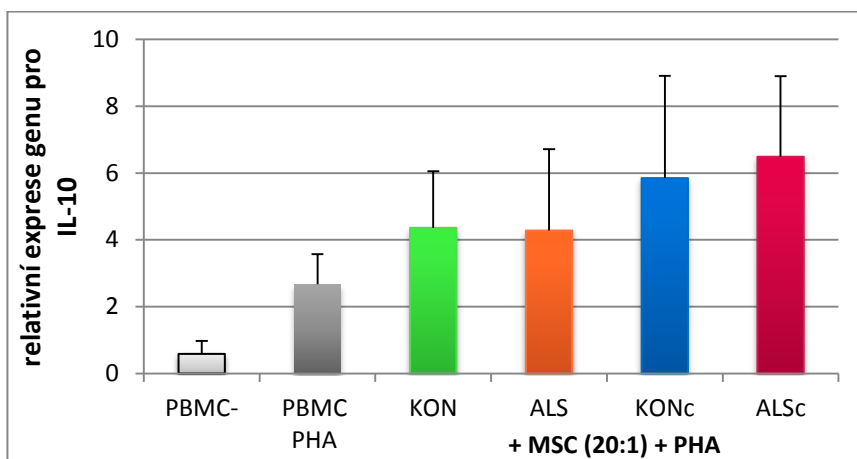
PBMC stimulované PHA byly kultivovány s MSC v různých poměrech (od 20 : 1 po 320 : 1) po dobu 72 hodin. Po označení mAb proti transkripčnímu faktoru Th2 lymfocytů GATA-3 byly vzorky měřeny na průtokovém cytometru. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento GATA-3⁺ buněk z CD4⁺ lymfocytů (Obrázek 24). Gatovací strategie je znázorněna na Obrázku 9 v metodické části.

MSC signifikantně zvyšovaly procento GATA-3⁺ Th lymfocytů v poměrech 20 : 1 až 80 : 1 bez ovlivnění cytokiny a po ovlivnění cytokiny v poměrech 40 : 1 a 80 : 1 (stanoveno Dunnettovým testem, $p < 0,05$). Porovnání ALS a kontrolní skupiny bylo provedeno t-testem a neukázalo signifikantní odlišnosti. Výraznější zvýšení procenta GATA-3⁺ Th lymfocytů bylo pozorováno bez ovlivnění prozánětlivými cytokiny a efekt se s nižší koncentrací MSC snižoval.



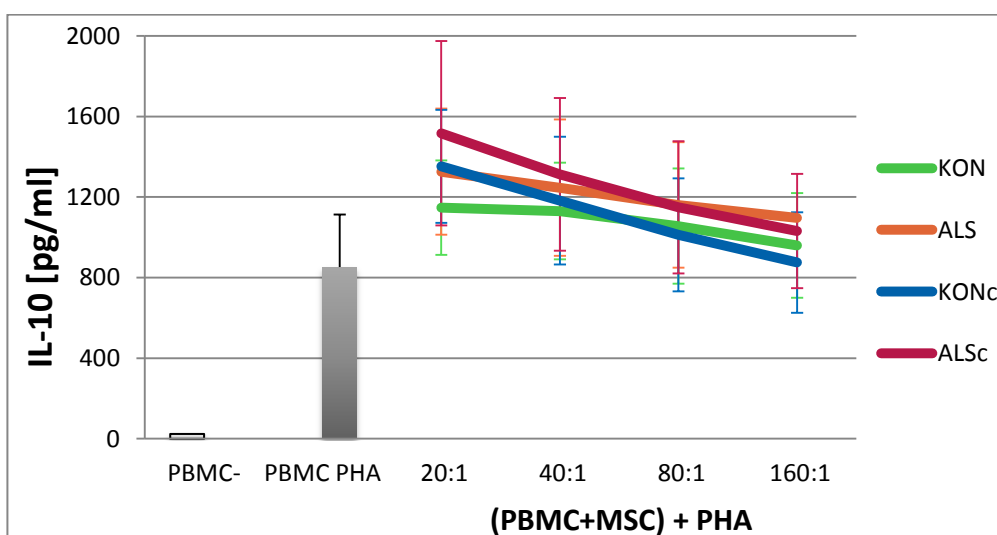
Obrázek 24: Vliv MSC na procento GATA-3⁺ Th lymfocytů. PBMC stimulované PHA byly kultivované po dobu 72 hodin s MSC z kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc). Procento GATA-3⁺ buněk z populace CD4⁺ T lymfocytů bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) nebo 15 vzorků (KON a KONc).

Vliv MSC na expresi genu pro IL-10 u PBMC byl stanoven metodou real-time PCR. PBMC byly stimulovány PHA a kultivovány s MSC v poměru 20 : 1 po dobu 48 hodin. MSC z kontrolní i ALS skupiny účinně zvyšovaly expresi genu pro IL-10 u PBMC (Obrázek 25). Statistická analýza neprokázala signifikantní odlišnost mezi efektem MSC z kontrolní a ALS skupiny. Efekt MSC na expresi genu pro IL-10 byl výraznější u MSC stimulovaných cytokiny.



Obrázek 25: Vliv MSC na expresi genu pro IL-10 u T lymfocytů. Metodou real-time PCR byla stanovena relativní exprese genu pro IL-10. Genová exprese byla měřena u PBMC stimulovaných PHA, které byly kultivované s MSC z kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc) po dobu 48 hodin. Každý sloupec představuje průměr + směrodatnou odchylku pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

Vliv MSC na produkci IL-10 byl u PBMC stimulovaných PHA stanoven metodou ELISA. PBMC stimulované PHA byly kultivovány s MSC v různých poměrech (od 20 : 1 po 160 : 1) po dobu 48 hodin (Obrázek 26). Získaná data byla statisticky zhodnocena dvoufaktorovým testem ANOVA s opakováním, který neprokázal signifikantní rozdíly v efektu na posílení produkce IL-10 mezi MSC z kontrolní a ALS skupiny.



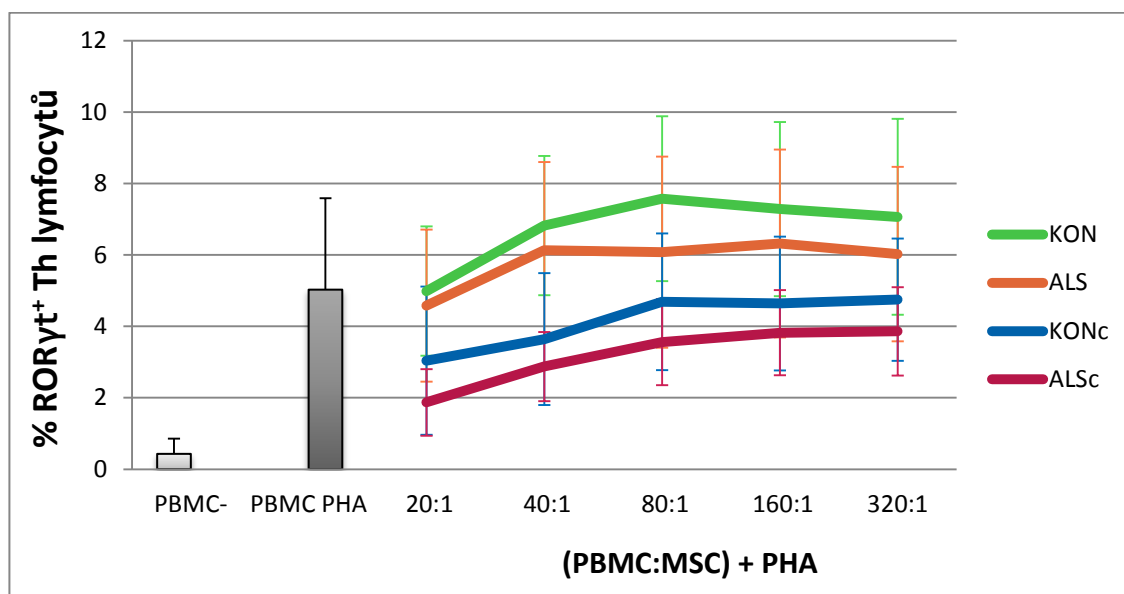
Obrázek 26: Vliv MSC na produkci IL-10 u T lymfocytů. Koncentrace IL-10 byla stanovena v supernatantech z PBMC stimulovaných PHA, které byly kultivované s MSC v různém poměru po dobu 48 hodin. Efekt MSC na produkci IL-10 byl měřen u kontrolní skupiny (KON) a ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc). Každý bod představuje průměr ± směrodatnou odchylku pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

8.4.3. Vliv MSC na vývoj a aktivaci Th17 lymfocytů

Th17 lymfocyty jsou charakteristické prozánětlivým působením a produkcí IL-17 a dalších prozánětlivých cytokinů. I když nebyla dosud jasně popsána jejich role v patogenezi ALS, je pravděpodobné, že snížení jejich procenta a potlačení jejich efektorových funkcí bude mít spíše pozitivní vliv na průběh ALS.

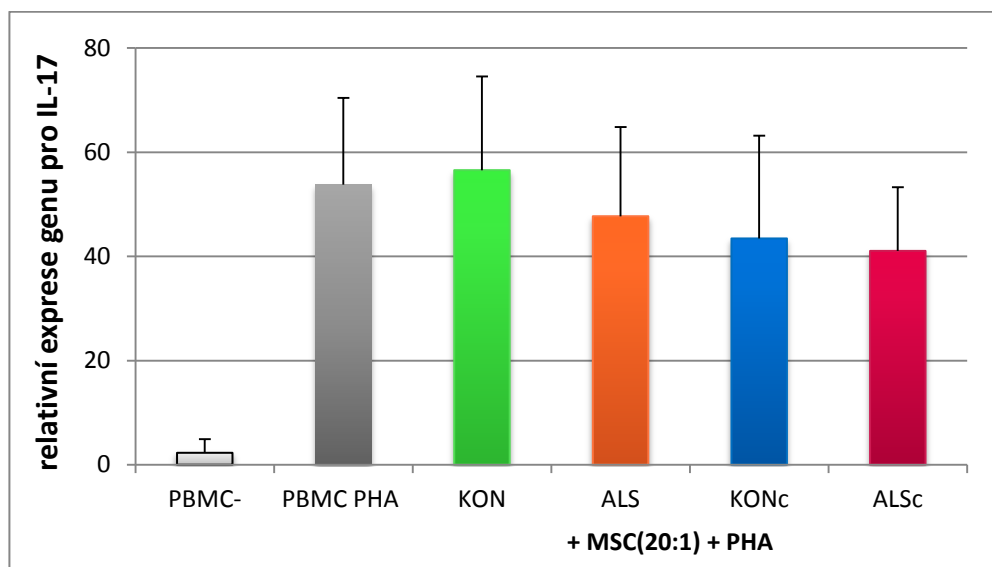
Vliv MSC na procento ROR γ ⁺ Th lymfocytů byl sledován pomocí průtokové cytometrie. PBMC byly kultivovány s MSC v různých poměrech (od 20 : 1 po 320 : 1) za stimulace PHA po dobu 72 hodin. Po označení protilátkou proti transkripčnímu faktoru Th17 lymfocytů ROR γ t byly vzorky měřeny na průtokovém cytometru. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento ROR γ ⁺ buněk z CD4⁺ T lymfocytů (Obrázek 27). Gatovací strategie je znázorněna na Obrázku 9 v metodické části.

Pouze MSC stimulované cytokiny (KONc a ALSc) signifikantně snižovaly procento ROR γ ⁺ Th17 lymfocytů v poměru 20 : 1 až 80 : 1. Bez ovlivnění cytokiny nebyl Dunnettovým testem prokázán inhibiční efekt u MSC z ALS ani kontrolní skupiny. Porovnání efektu MSC z ALS a kontrolní skupiny bylo provedeno t-testy a neukázalo signifikantní odlišnosti. Snížení procenta Th17 lymfocytů bylo tedy pozorováno pouze u MSC ovlivněných prozánětlivými cytokiny a efekt byl závislý na koncentraci MSC.



Obrázek 27: Vliv MSC na procento ROR γ ⁺ Th lymfocytů. PBMC stimulované PHA byly kultivovány s MSC z kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc) po dobu 72 hodin. Procento ROR γ ⁺ buněk z populace CD4⁺ T lymfocytů bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) nebo 15 vzorků (KON a KONc).

Efekt MSC na expresi genu pro IL-17 byl měřen metodou real-time PCR (Obrázek 28). PBMC stimulované PHA byly kultivovány s MSC v poměru 20 : 1. Statistická analýza t-testem neprokázala signifikantní odlišnost mezi kontrolní a ALS skupinou. MSC ovlivněné cytokiny výrazněji potlačovaly expresi genu pro IL-17, rozdíl mezi efektem KON a KONc byl signifikantní ($p < 0,05$). Dunnettovým testem nebyl prokázán statisticky významný inhibiční efekt na expresi genu pro IL-17 ani u jedné skupiny.



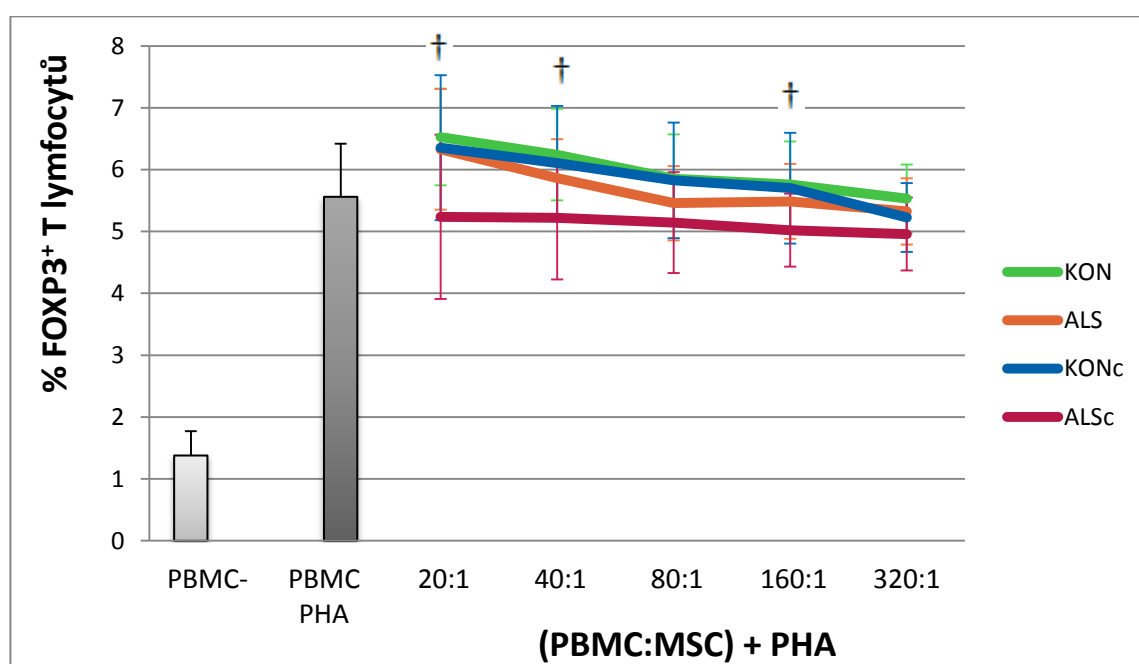
Obrázek 28: Vliv MSC na expresi genu pro IL-17 u T lymfocytů. Metodou real-time PCR byla stanovena relativní exprese genu pro IL-17. Genová exprese byla měřena u PBMC stimulovaných PHA, které byly kultivované s MSC kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc). Každý sloupec představuje průměr + SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) a 15 vzorků (KON a KONc).

8.4.4. Vliv MSC na vývoj Treg lymfocytů

Treg lymfocyty přispívají k zajištění periferní tolerance a jsou nezbytné pro zachování homeostázy v organismu. Jejich protektivní role v patogenezi ALS byla ověřena na experimentálních modelech. Bylo popsáno, že MSC mohou podporovat diferenciaci Treg lymfocytů produkcí TGF- β , což může přispívat k potlačení zánětu u ALS.

Vliv MSC na procento FOXP3⁺ T lymfocytů byl určován metodou průtokové cytometrie. PBMC stimulované PHA byly kultivovány s MSC v různých poměrech (od 20 : 1 po 320 : 1) po dobu 72 hodin. Po označení protilátkou proti transkripčnímu faktoru Treg lymfocytů FOXP3 byly vzorky měřeny na průtokovém cytometru. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento FOXP3⁺ buněk z CD4⁺ lymfocytů (Obrázek 29). Gatovací strategie je znázorněna na Obrázku 9 v metodické části.

MSC z ALS i kontrolní skupiny signifikantně zvyšovaly procento FOXP3⁺ lymfocytů pouze v nejvyšší koncentraci 20 : 1 (stanoveno Dunnettovým testem, $p < 0,05$). U MSC stimulovaných cytokiny (KONc a ALSc) nebylo prokázáno signifikantní zvýšení procenta FOXP3⁺ T lymfocytů. Působení ALSc nevedlo k žádnému zvýšení procenta Treg lymfocytů. Porovnání efektu ALS a kontrolní skupiny bylo provedeno t-testy a ukázalo signifikantní rozdíl mezi MSC ovlivněnými cytokiny z ALS a kontrolní skupiny v koncentracích 20 : 1, 40 : 1 a 160 : 1 ($p < 0,05$). V koncentraci 80 : 1 byl rozdíl na hranici statistické významnosti. Výsledky tohoto experimentu naznačují, že ovlivnění MSC z ALS skupiny cytokiny v tomto případě vedlo ke snížení indukčního efektu na vývoj FOXP3⁺ T lymfocytů.



Obrázek 29: Vliv MSC na procento FOXP3⁺ T lymfocytů. PBMC stimulované PHA byly kultivované s MSC z kontrolní skupiny (KON), ALS skupiny (ALS) a MSC stimulovanými cytokiny (KONc a ALSc) po dobu 72 hodin. Procento FOXP3⁺ buněk z populace CD4⁺ T lymfocytů bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie. Každý bod představuje průměr \pm SD pro skupinu 14 vzorků (ALS a ALSc) nebo 15 vzorků (KON a KONc). Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla hodnocena t-testem. † označuje signifikantní rozdíl mezi ALSc a KONc ($p < 0,05$).

Diskuse

MSC z kostní dřeně jsou považovány za vhodný typ kmenových buněk pro autologní použití v buněčné terapii. Využití MSC je testováno v klinických studiích pro jejich rozsáhlé reparační a imunomodulační účinky. Imunosupresivní působení MSC by mohlo mít pozitivní efekt na navození tolerance u autoimunitních onemocnění či nemocí se zapojením imunopatologických reakcí v progresi onemocnění. Nicméně, doposud nebylo dostatečně popsáno, zda jsou MSC izolované od pacientů s imunologicky podmíněnými onemocněními shodné s MSC od zdravých dárců nebo zda jsou naopak jejich fenotypové či funkční vlastnosti ovlivněny zánětlivými procesy probíhajícími v organismu pacienta.

Studie zabývající se funkční charakterizací MSC izolovaných z tkání pacientů s revmatoidní artritidou (Sun et al. 2015), roztroušenou sklerózou (de Oliveira et al. 2015) či systémovým lupusem erythematodes (Geng et al. 2014) ukázaly na pozměněné funkční vlastnosti (například omezenou migraci, proliferační kapacitu, nižší osteogenní diferenciací potenciál či sníženou aktivitu telomerázy) ve srovnání s MSC od zdravých dárců. V jiných studiích naopak odlišnosti ve vlastnostech MSC u pacientů s imunologicky podmíněnými nemocemi nebyly pozorovány (Cipriani et al. 2013; Larghero et al. 2008).

Ferrero et al. (2008) testovali MSC od pacientů s ALS a srovnávali je z hlediska proliferační aktivity, fenotypu, diferenciacího potenciálu, délky telomer a změn v karyotypu s MSC od zdravých dárců. Z jejich výsledků vyplývá, že nepozorovali odlišnosti ve sledovaných parametrech. V současné době se však ukazuje, že by studium dalších, zejména funkčních a imunomodulačních, vlastností MSC mohlo odhalit odlišnosti v kvalitě MSC, která je pro účinnost buněčné terapie nezbytná.

V této práci jsme se zaměřili na srovnání imunomodulačních vlastností MSC izolovaných z kostní dřeně pacientů s ALS a zdravých dárců. MSC jsme sledovali z hlediska vlivu na buňky přirozené imunity, schopnosti inhibovat proliferaci a aktivaci lymfocytů a ovlivňovat vývoj a funkce různých populací CD4⁺ T lymfocytů. Celkem byly testovány MSC od 14 pacientů s ALS a od 15 zdravých dárců.

U MSC z ALS i kontrolní skupiny byl ověřen fenotyp, přičemž populace obsahovala > 95 % CD105⁺ a CD44⁺ buněk a < 2 % CD11b⁺ a CD45⁺ buněk. Mezi skupinami nebyly zaznamenány významné rozdíly, což je v souladu s publikovanými výsledky studií zaměřených na ALS (Ferrero et al. 2008) i jiná imunologicky podmíněná onemocnění (Larghero et al. 2008).

U obou skupin MSC byla po ovlivnění diferenciacními činidly rovněž prokázána schopnost diferenciacce v adipocyty a osteoblasty. U MSC z ALS skupiny byla pozorována vyšší exprese genů *PPARG* a *ADPC*, naznačující vyšší míru diferenciacce v adipocyty. Naproti tomu Ferrero et al. (2008) nepozorovali odlišnosti v diferenciacním potenciálu MSC od pacientů s ALS a zdravých dárců. V jejich studii byl však diferenciacní potenciál ověřován pouze mikroskopicky. U jiných onemocnění, například u systémového lupusu, byla popsána zhoršená schopnost osteogenní diferenciacce (Tang et al. 2013), ale studie různých autorů se v tomto ohledu rozcházejí (Geng et al. 2014). V našich experimentech jsme zaznamenali u MSC z ALS skupiny pouze zvýšení specifické diferenciacce v adipocyty vyvolané indukčními činidly a nikoliv i zvýšení spontánní diferenciacce v kontrolních vzorcích. Zvýšení diferenciacního potenciálu u MSC z ALS skupiny je tedy pravděpodobně způsobeno vyšší citlivostí na diferenciacní činidla nebo vyšší rychlostí diferenciacce.

MSC z ALS i kontrolní skupiny vykazovaly srovnatelnou metabolickou aktivitu a ovlivnění cytokiny nemělo na tento měřený parametr vliv. Předpokládali jsme tedy, že při stejné počáteční koncentraci MSC v experimentech budou efekty MSC z ALS i kontrolní skupiny na sledované parametry vzájemně porovnatelné.

Dále byla u MSC sledována exprese genů pro imunomodulační molekuly a produkce HGF. MSC konstitutivně exprimovaly geny pro TGF- β , COX-2, VEGF a IL-6, inducibilně exprimovaly geny pro TSG-6, IDO a PD-L1 a u buněk ovlivněných prozánětlivými cytokiny došlo ke zvýšení exprese genu pro IL-6 a COX-2. U MSC z ALS skupiny byla zaznamenána signifikantně vyšší exprese genu pro IL-6 a naopak snížená sekrece HGF ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvýšenou expresi genu pro IL-6 pozorovali také v práci Cipriani et al. (2013) u MSC od pacientů se systémovou sklerodermií a zvýšenou hladinu IL-6 spojovali s lepší schopností MSC inhibovat proliferaci T lymfocytů a s lepšími imunosupresivními účinky MSC na lymfocyty. Ve studii de Oliveira et al. (2015) zabývající se porovnáním MSC pacientů s roztroušenou sklerózou a zdravých dárců byla popsána odlišnost v transkripčním profilu MSC. U MSC od pacientů s roztroušenou sklerózou byla pozorována snížená exprese genů *HGF* a *TGF- β 1* a komponent signální dráhy HGF. V jejich studii byla snížená exprese *HGF* genu a genů jeho signální dráhy spojována s horší schopností MSC inhibovat proliferaci lymfocytů, produkovat TGF a podporovat produkci IL-10 u lymfocytů při kultivaci MSC s PBMC. V naší studii jsme naopak u MSC z ALS skupiny pozorovali

srovnatelnou schopnost inhibovat proliferaci lymfocytů a pouze mírné zvýšení exprese *PD-L1* *TGF-β* a *VEGF*.

Schopnost MSC inhibovat proliferaci PBMC byla u ALS i kontrolní skupiny srovnatelná a závislá na poměru PBMC a MSC v kultuře. Signifikantní inhibici proliferace PBMC stimulovaných PHA jsme pozorovali v poměru 5 : 1 a 10 : 1. V poměru 20 : 1 a vyšších byla již proliferace PBMC srovnatelná s kontrolním vzorkem PBMC stimulovaných PHA bez přítomnosti MSC. Schopnost MSC inhibovat proliferaci PBMC *in vitro* byla popsána v celé řadě studií. Při srovnání inhibičních účinků MSC na proliferaci PBMC u pacientů s roztroušenou sklerózou pozorovali de Oliveira et al. (2015) horší schopnosti inhibice proliferace ve srovnání s MSC od zdravých dárců. Naopak srovnatelnou schopnost inhibice proliferace PBMC u MSC od pacientů s roztroušenou sklerózou a zdravých dárců pozorovali Mazzanti et al. (2008).

Posun rovnováhy mezi protizánětlivým a prozánětlivým fenotypem mikroglíí je jedním z mechanismů rozvoje neurotoxické odpovědi u pacientů s ALS. Tento posun je mimo jiné spojen i se změnou cytokinového prostředí a posunem od produkce neurotrofických faktorů a protizánětlivých cytokinů jako je IL-10 k produkci prozánětlivých cytokinů včetně TNF- α , IL-1 β a IL-6. V této souvislosti byla testována schopnost MSC ovlivňovat produkci IL-10 a TNF- α u PBMC stimulovaných LPS. U PBMC byla pozorována zvýšená produkce IL-10 při kultivaci s MSC bez ovlivnění v poměru 20 : 1 a 40 : 1 (ALS a KON) a ve všech poměrech u MSC ovlivněných cytokiny (KONc a ALSc). Mezi efektem MSC z ALS a kontrolní skupiny nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly. Kwon et al. (2014) pozorovali signifikantní zvýšení produkce IL-10 a exprese genu pro IL-10 u PBMC bez stimulace mitogeny při kultivaci s MSC od pacientů s ALS. Dále jsme zjistili, že inhibice produkce TNF- α u PBMC kultivovaných s MSC pacientů s ALS byla signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny, přičemž u MSC ovlivněných prozánětlivými cytokiny byly naproti tomu efekty kontrolní skupiny (KONc) srovnatelné se skupinou ALS (ALSc), protože stimulace cytokiny u MSC z ALS skupiny v tomto případě nevedla ke zvýšení inhibičních schopností. De Oliveira et al. (2015) naopak pozorovali u PBMC kultivovaných s MSC od pacientů s roztroušenou sklerózou srovnatelnou hladinu TNF- α jako u kontrolních vzorků. Odlišné efekty mohou souviset s jiným typem onemocnění nebo také s absencí mitogenu při kultivaci PBMC oproti našim experimentům.

V tomto experimentu jsme tedy u MSC z kontrolní i ALS skupiny pozorovali potlačení produkce prozánětlivého TNF- α a naopak podporu produkce protizánětlivého IL-10 u PBMC stimulovaných LPS. V patogenezi ALS byla popsána klíčová role mikroglíí a monocytů v patogenezi ALS a podpora jejich protizánětlivé polarizace může představovat jeden z důležitých mechanismů terapeutického účinku MSC při léčbě ALS.

Některé složky adaptivní imunity včetně Tc, Th1 a Th17 lymfocytů se značnou měrou účastní imunopatologických reakcí, které se podílí na progresi ALS. V další části této práce jsme se tedy zaměřili na sledování vlivu MSC na různé populace T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie a dále sledování vlivu na funkční vlastnosti T lymfocytů na úrovni genové exprese a produkce cytokinů. Vliv MSC na aktivaci Th a Tc lymfocytů byl stanoven na základě exprese aktivačního znaku CD25. V našich experimentech bylo pozorováno statisticky významné snížení aktivace Th i Tc lymfocytů pouze při použití nejvyšší koncentrace MSC (20 : 1). Ve schopnosti inhibovat aktivaci Th lymfocytů nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi MSC z kontrolní a ALS skupiny. Po ovlivnění prozánětlivými cytokiny signifikantně lépe inhibovaly aktivaci Tc lymfocytů MSC z kontrolní skupiny (KONc) ve srovnání s MSC z ALS skupiny (ALSc). Schopnost MSC inhibovat aktivaci T lymfocytů byla popsána v řadě studií (Le Blanc et al. 2004; Park et al. 2011), ale existují i práce, které nezaznamenaly žádnou významnou inhibici exprese aktivačních znaků v přítomnosti MSC (Ramasamy et al. 2008). Snížená schopnost MSC z ALS skupiny potlačovat aktivaci T lymfocytů by tak neměla mít na klinický efekt těchto MSC významný vliv.

Dále jsme sledovali účinek MSC na procentuální zastoupení subpopulací CD4⁺ T lymfocytů. MSC z kontrolní i ALS skupiny účinně snižovaly procento Th1 lymfocytů a zároveň zvyšovaly procento Th2 lymfocytů, přičemž mezi ALS a kontrolní skupinou nebyly zaznamenány signifikantní odlišnosti. Zároveň jsme sledovali účinek MSC na produkci a expresi genů pro cytokiny typické pro tyto dvě populace Th lymfocytů. MSC z obou skupin srovnatelně potlačovaly expresi genu pro IFN- γ , charakteristického pro Th1 lymfocyty, a rovněž snižovaly jeho produkci u PBMC stimulovaných PHA. Zároveň MSC posilovaly expresi genu pro IL-10, charakteristického pro Th2 lymfocyty, a zvyšovaly jeho produkci. Naše pozorování jsou částečně v souladu se studií Kwon et al. (2014), kteří rovněž pozorovali u MSC od pacientů s ALS zvýšení exprese *GATA-3* i množství IL-10, což svědčí o posunu rovnováhy směrem k Th2 lymfocytům, ale nepozorovali vliv MSC na Th1 lymfocyty.

Schopnost MSC posouvat rovnováhu Th1/Th2 lymfocytů je zásadní pro terapeutické účinky buněčné terapie ALS, jelikož byl popsán přesmyk z protektivní Th2 na prozánětlivou Th1 odpověď v neurotoxické fázi ALS.

Současně jsme sledovali vliv MSC na procento Th17 a Treg lymfocytů. MSC z obou skupin účinně snižovaly procento Th17 lymfocytů pouze pokud byly předem stimulovány cytokiny a zároveň zvyšovaly procento Treg lymfocytů. MSC z kontrolní skupiny, ale nikoliv MSC z ALS skupiny, ovlivněné cytokiny byly schopné účinně zvyšovat procento Treg lymfocytů. Zároveň MSC z obou skupin srovnatelně potlačovaly expresi genu pro IL-17, charakteristického pro Th17 lymfocyty, a inhibice byla opět patrná spíše u MSC ovlivněných prozánětlivými cytokiny. U MSC od pacientů s revmatoidní artritidou byla popsána snížená schopnost inhibovat Th17 lymfocyty (Sun et al. 2015). Naše výsledky redukovanou schopnost MSC z ALS skupiny snižovat procento Th17 lymfocytů neprokázaly, naopak byla zjištěna výraznější, nikoliv však signifikantně, inhibice u MSC z ALS skupiny. MSC od pacientů se systémovou sklerodermií srovnatelně podporovaly vývoj Treg lymfocytů jako MSC z kontrolní skupiny (Cipriani et al. 2013). Naproti tomu v našich experimentech byla prokázána snížená schopnost MSC ovlivněných cytokiny z ALS skupiny indukovat Treg lymfocyty.

V současnosti existuje pouze omezené množství studií, které by se zabývaly porovnáním MSC od zdravých dárců a od pacientů s ALS. Část těchto studií navíc porovnává tyto buňky pouze z hlediska fenotypu a diferenciačního potenciálu a nikoliv z hlediska jejich působení na buňky imunitního systému. Proto byly do diskuse zahrnuty i některé práce srovnávající MSC od pacientů s vybranými autoimunitními chorobami s MSC od zdravých dárců. V žádné z uvedených studií navíc nebyl sledován vliv prozánětlivých cytokinů na imunomodulační vlastnosti MSC, přičemž některé rozdíly byly pozorovány právě u MSC ovlivněných prozánětlivými cytokiny.

Pokud bychom měli shrnout výsledky této práce, tak jsme zaznamenali u MSC z ALS skupiny sníženou schopnost potlačovat aktivaci Tc lymfocytů a naopak zvyšovat procento Treg lymfocytů. MSC z ALS skupiny zároveň prokázaly zvýšenou schopnost tlumit produkci prozánětlivého cytokinu TNF- α a vyšší schopnost diferenciace v adipocyty. U MSC z ALS skupiny byla také prokázána vyšší exprese genu pro IL-6 a zároveň snížená produkce HGF. Kombinace snížené produkce HGF a zvýšené exprese genu pro IL-6 by mohla částečně vysvětlovat zhoršenou schopnost těchto MSC zvyšovat procento Treg lymfocytů. Nutno dodat, že MSC z kontrolní a ALS skupiny se

lišily i v expresi genů pro další imunomodulační molekuly jako je PD-L1, TGF- β nebo VEGF, ale tyto rozdíly již nebyly signifikantní. Protože působení imunomodulačních molekul MSC je komplexní proces zahrnující součinnost několika molekul, je obtížné přesně určit, které rozdíly v expresi imunomodulačních molekul mohly způsobit pozorované rozdíly.

Rovněž se zdá, že MSC z ALS skupiny reagují odlišně na působení prozánětlivých cytokinů, protože v případě efektu na zvýšení procenta Treg lymfocytů došlo u MSC z ALS skupiny po ovlivnění cytokiny ke snížení schopnosti indukovat Treg lymfocyty a stejně tak v případě potlačení produkce TNF- α nedošlo k očekávanému zvýšení inhibičního efektu u MSC z ALS skupiny ovlivněných cytokiny.

Výsledky našich experimentů neprokázaly zásadní odlišnosti ve fenotypu, v expresi genů pro imunomodulační molekuly ani v metabolické aktivitě u MSC z kontrolní a ALS skupiny. Sledování funkčních vlastností a vlivu na buňky imunitního systému poukázalo na částečně pozměněnou reaktivitu MSC od pacientů s ALS na stimulaci prozánětlivými cytokiny. Protože zjištěné rozdíly mezi MSC z kontrolní a ALS skupiny představují u MSC z ALS skupiny kombinaci zhoršení schopnosti potlačovat aktivaci Tc lymfocytů a zvyšovat procento Treg lymfocytů a naopak zlepšení schopnosti potlačovat produkci prozánětlivého cytokinu TNF- α , nelze s určitostí říct, že se u těchto buněk jedná o zhoršení jejich protizánětlivého působení. Terapii autologními MSC od pacientů s ALS lze nadále považovat za jednu z možných variant léčby ALS. Nicméně, pro potvrzení našich výsledků bude nezbytné testovat širší spektrum parametrů na větší skupině testovaných vzorků a především se zaměřit na podrobnější studium odpovědivosti MSC od pacientů s ALS na prozánětlivé prostředí.

Závěr

- Při charakterizaci MSC z kontrolní a ALS skupiny byla zjištěna srovnatelná exprese povrchových znaků (> 95 % CD44⁺ a CD105⁺ buněk a < 2 % CD11b⁺ a CD45⁺ buněk), schopnost diferenciaci i metabolická aktivita.
- MSC z kontrolní i ALS skupiny konstitutivně exprimovaly geny pro imunomodulační molekuly IL-6, TGF- β , COX-2 a VEGF, přičemž působení prozánětlivých cytokinů u nich navodilo nebo zvyšovalo expresi genů pro PD-L1, COX-2, TSG-6, IL-6 a IDO. U MSC z ALS skupiny byla v porovnání s MSC z kontrolní skupiny zjištěna signifikantně vyšší exprese genu pro IL-6 a pod vlivem prozánětlivého prostředí naopak snížená produkce HGF.
- MSC z kontrolní i ALS skupiny posouvaly u PBMC stimulovaných LPS rovnováhu mezi produkovánými cytokiny a zvyšovaly produkci IL-10 a naopak potlačovaly produkci TNF- α . MSC z ALS skupiny signifikantně více snižovaly produkci TNF- α v porovnání s MSC z kontrolní skupiny. Po ovlivnění prozánětlivými cytokiny byly naopak efekty MSC z kontrolní a ALS skupiny srovnatelné, protože stimulace cytokiny u MSC z ALS skupiny v tomto případě nevedla ke zvýšení inhibičních schopností.
- MSC z kontrolní i ALS skupiny potlačovaly aktivaci Th a Tc lymfocytů. MSC z ALS skupiny ovlivněné cytokiny potlačovaly aktivaci Tc lymfocytů méně efektivně než MSC z kontrolní skupiny.
- MSC z kontrolní i ALS skupiny srovnatelně snižovaly procento Th1 lymfocytů a potlačovaly produkci IFN- γ a zároveň zvyšovaly procento Th2 lymfocytů a podporovaly produkci IL-10.
- MSC z kontrolní i ALS skupiny ovlivněné prozánětlivými cytokiny snižovaly procento Th17 lymfocytů a potlačovaly expresi genu pro IL-17. Zároveň tyto MSC zvyšovaly procento Treg lymfocytů. MSC z ALS skupiny ovlivněné prozánětlivými cytokiny procento Treg lymfocytů na rozdíl od MSC z kontrolní skupiny ovlivněných cytokiny nezvyšovaly.

Vystavení MSC působení prozánětlivých cytokinů u nich ve většině případů vede ke zvýšení imunomodulačních účinků. Nicméně se zdá, že MSC z ALS skupiny reagují v porovnání s MSC z kontrolní skupiny na působení prozánětlivých cytokinů odlišně. U MSC z ALS skupiny došlo po ovlivnění cytokiny ke snížení schopnosti indukovat Treg lymfocyty a naopak nedošlo ke zvýšení produkce HGF ani ke zvýšení inhibičního efektu na produkci TNF- α .

Seznam použité literatury

- Aggarwal, S., and M. F. Pittenger. 2005. "Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeic Immune Cell Responses." *Blood* 105: 1815–22.
- Álvaro-Gracia, J. M., J. A. Jover, R. García-Vicuña, L. Carreño, A. Alonso, S. Marsal, F. Blanco, et al. 2016. "Intravenous Administration of Expanded Allogeic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Refractory Rheumatoid Arthritis (Cx611): Results of a Multicentre, Dose Escalation, Randomised, Single-Blind, Placebo-Controlled Phase Ib/IIa Clinical Trial." *Annals of the Rheumatic Diseases*, ahead of print.
- Andersen, P. M., S. Abrahams, G. D. Borasio, M. de Carvalho, A. Chio, P. Van Damme, O. Hardiman, et al. 2012. "EFNS Guidelines on the Clinical Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis (MALS) - Revised Report of an EFNS Task Force." *European Journal of Neurology* 19: 360–75.
- Barbeito, L. H., M. Pehar, P. Cassina, M. R. Vargas, H. Peluffo, L. Viera, A. G. Estévez, and J. S. Beckman. 2004. "A Role for Astrocytes in Motor Neuron Loss in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Brain Research Reviews* 47: 263–74. Review.
- Batten, P., P. Sarathchandra, J. W. Antoniow, S. Tay, M. W. Lowdell, P. M. Taylor, and M. H. Yacoub. 2006. "Human Mesenchymal Stem Cells Induce T Cell Anergy and Downregulate T Cell Allo-Responses via the TH2 Pathway: Relevance to Tissue Engineering Human Heart Valves." *Tissue Engineering* 12: 2263–73.
- Beers, D. R., J. S. Henkel, W. Zhao, J. Wang, S. H. Appel, and W. Cleveland. 2008. "CD4+ T Cells Support Glial Neuroprotection, Slow Disease Progression, and Modify Glial Morphology in an Animal Model of Inherited ALS." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 15558–63.
- Bensimon, G., L. Lacomblez, and V. Meininger. 1994. "A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The New England Journal of Medicine* 330: 585–91.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. "Reciprocal Developmental Pathways for the Generation of Pathogenic Effector TH17 and Regulatory T Cells." *Nature* 441: 235–38.
- Boido, M., A. Piras, V. Valsecchi, G. Spigolon, K. Mareschi, I. Ferrero, A. Vizzini, et al. 2014. "Human Mesenchymal Stromal Cell Transplantation Modulates Neuroinflammatory Milieu in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Cytotherapy* 16: 1059–72.
- Carbajal, K. S., Ch. Schaumburg, R. Strieter, J. Kane, T. E. Lane, and A. A. James. 2010. "Migration of Engrafted Neural Stem Cells Is Mediated by CXCL12 Signaling through CXCR4 in a Viral Model of Multiple Sclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 11068–73.
- Cipriani, P., P. Di Benedetto, V. Liakouli, B. Del Papa, M. Di Padova, M. Di Ianni, A. Marrelli, E. Alesse, and R. Giacomelli. 2013. "Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Scleroderma Patients (SSc) Preserve Their Immunomodulatory Properties Although Senescent and Normally Induce T Regulatory Cells (Tregs) with a Functional Phenotype: Implications for Cellular-Based Therapy." *Clinical and Experimental Immunology* 173: 195–206.

- de Oliveira, G. L. V., K. W. A. de Lima, A. M. Colombini, D. G. Pinheiro, R. A. Panepucci, P. V. B. Palma, D. G. Brum, et al. 2015. "Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Multiple Sclerosis Patients Have Distinct Gene Expression Profile and Decreased Suppressive Function Compared with Healthy Counterparts." *Cell Transplantation* 24: 151–65.
- Deda, H., M. C. Inci, E. Kürekçi, A. Sav, K. Kayihan, E. Özgün, G. E. Ustünsoy, and S. Kocabay. 2009. "Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients by Autologous Bone Marrow-Derived Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A 1-Year Follow-Up." *Cytotherapy* 11: 18–25.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, and A. M. Gianni. 2002. "Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli." *Blood* 99: 3838–43.
- Djouad, F., L.-M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Pence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, Ch. Jorgensen, and D. Noël. 2007. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism." *Stem Cells* 25: 2025–32.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8: 315–17.
- Duffy, M. M., T. Ritter, R. Ceredig, and M. D. Griffin. 2011. "Mesenchymal Stem Cell Effects on T-Cell Effector Pathways." *Stem Cell Research & Therapy* 2: 34–43. Review.
- English, K. 2012. "Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cell Immunomodulation." *Immunology and Cell Biology* 91: 19–26. Review.
- Feldman, E. L., N. M. Boulis, J. Hur, K. Johe, S. B. Rutkove, T. Federici, M. Polak, J. Bordeau, Stacey A Sakowski, and Jonathan D Glass. 2014. "Intraspinal Neural Stem Cell Transplantation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Phase 1 Trial Outcomes." *Annals of Neurology* 75: 363–73.
- Ferrero, I., L. Mazzini, D. Rustichelli, M. Gunetti, K. Mareschi, L. Testa, N. Nasuelli, G.D. Oggioni, and F. Fagioli. 2008. "Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Healthy Donors and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients." *Cell Transplantation* 17: 255–66.
- Fialová, L., J. Švarcová, A. Bartos, P. Ridzoň, I. Malbohan, O. Keller, and R. Rusina. 2010. "Cerebrospinal Fluid and Serum Antibodies against Neurofilaments in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis." *European Journal of Neurology* 17: 562–66.
- Forostyak, S., A. Homola, K. Turnovcová, P. Svítal, P. Jendelová, and E. Syková. 2014. "Intrathecal Delivery of Mesenchymal Stromal Cells Protects the Structure of Altered Perineuronal Nets in SOD1 Rats and Amends the Course of ALS." *Stem Cells* 32: 3163–72.
- Forostyak, S., P. Jendelova, M. Kapcalova, D. Arboleda, and E. Sykova. 2011. "Mesenchymal Stromal Cells Prolong the Lifespan in a Rat Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Cytotherapy* 13: 1036–46.

- François, M., R. Romieu-Mourez, M. Li, and J. Galipeau. 2012. "Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation." *Molecular Therapy* 20: 187–95.
- Gao, P., J. Yang, X. Gao, D. Xu, D. Niu, J. Li, and Q. Wen. 2015. "Salvianolic Acid B Improves Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Alveolar Epithelial Cells Type I via Wnt Signaling." *Molecular Medicine Reports* 12: 1971–76.
- Garbuzova-Davis, S., D. G. Hernandez-Ontiveros, M. C. O. Rodrigues, E. Haller, A. Frisina-Deyo, S. Mirtyl, S. Sallot, S. Saporta, Cesario V. Borlongan, and Paul R. Sanberg. 2012. "Impaired Blood-Brain/spinal Cord Barrier in ALS Patients." *Brain Research* 1469: 114–28.
- Geng, L., X. Li, X. Feng, J. Zhang, D. Wang, J. Chen, R. Liu, H. Chen, and L. Sun. 2014. "Association of TNF- α with Impaired Migration Capacity of Mesenchymal Stem Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus." *Journal of Immunology Research* 2014: 1–14.
- Ghannam, S., J. Pène, G. Torcy-Moquet, Ch. Jorgensen, and H. Yssel. 2010. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype." *Journal of Immunology* 185: 302–12.
- Gharibi, T., M. Ahmadi, N. Seyfizadeh, F. Jadidi-Niaragh, and M. Yousefi. 2015. "Immunomodulatory Characteristics of Mesenchymal Stem Cells and Their Role in the Treatment of Multiple Sclerosis." *Cellular Immunology* 293: 113–21. Review.
- Gothelf, Y., N. Abramov, A. Harel, and D. Offen. 2014. "Safety of Repeated Transplantations of Neurotrophic Factors-Secreting Human Mesenchymal Stromal Stem Cells." *Clinical and Translational Medicine* 3: 1–11.
- Gubert, F., A. B. Decotelli, I. Bonacossa-Pereira, F. R. Figueiredo, C. Zaverucha-Do-Valle, F. Tovar-Moll, L. Hoffmann, T. P. Urmenyi, M. F. Santiago, and R. Mendez-Otero. 2016. "Intraspinal Bone-Marrow Cell Therapy at Pre-and Symptomatic Phases in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Stem Cell Research & Therapy* 41: 1–14.
- Henkel, J. S., D. R. Beers, S. Wen, A. L. Rivera, K. M. Toennis, J. E. Appel, W. Zhao, D. H. Moore, S. Z. Powell, and S. H. Appel. 2013. "Regulatory T-Lymphocytes Mediate Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression and Survival." *EMBO Molecular Medicine* 5: 64–79.
- Henkel, J. S., J. I. Engelhardt, L. Siklós, E. P. Simpson, S. H. Kim, T. Pan, J. C. Goodman, T. Siddique, D. R. Beers, and S. H. Appel. 2004. "Presence of Dendritic Cells, MCP-1, and Activated Microglia/Macrophages in Amyotrophic Lateral Sclerosis Spinal Cord Tissue." *Annals of Neurology* 55: 221–35.
- Hof-Nahor, I., L. Leshansky, S. Shivtiel, L. Eldor, D. Aberdam, J. Itskovitz-Eldor, and S. Berrih-Aknin. 2012. "Human Mesenchymal Stem Cells Shift CD8+ T Cells towards a Suppressive Phenotype by Inducing Tolerogenic Monocytes." *Journal of Cell Science* 125: 4640–50.
- Hooten, K. G., D. R. Beers, W. Zhao, and S. H. Appel. 2015. "Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neurotherapeutics* 12: 364–75. Review.

- Chamberlain, G., H. Smith, G. E. Rainger, and J. Middleton. 2011. "Mesenchymal Stem Cells Exhibit Firm Adhesion, Crawling, Spreading and Transmigration across Aortic Endothelial Cells: Effects of Chemokines and Shear." *PLoS ONE*, no. 9: e25663.
- Chan, J. L., K. C. Tang, A. P. Patel, L. M. Bonilla, N. Pierobon, N. M. Ponzio, and P. Rameshwar. 2006. "Antigen-Presenting Property of Mesenchymal Stem Cells Occurs during a Narrow Window at Low Levels of Interferon-Gamma." *Blood* 107: 4817–24.
- Charcot, J.-M. 1869. *Deux Cas D'atrophie Musculaire Progressive Avec Lésions de La Substance Grise et Des Faisceaux Antérolatéraux de La Moelle Épinière*. Paris.
- Chatterjee, D., N. Marquardt, D. M. Tufa, T. Hatlapatka, R. Hass, C. Kasper, C. von Kaisenberg, Reinhold Ernst Schmidt, and Roland Jacobs. 2014. "Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Utilise Activin-A to Suppress Interferon-Gamma Production by Natural Killer Cells." *Frontiers in Immunology* 5: 1–8.
- Chen, P.-M., K.-J. Liu, P.-J. Hsu, Ch.-F. Wei, C.-H. Bai, L.-J. Ho, H.-K. Sytwu, and B. L. Yen. 2014. "Induction of Immunomodulatory Monocytes by Human Mesenchymal Stem Cell-Derived Hepatocyte Growth Factor through ERK1/2." *Journal of Leukocyte Biology* 96: 295–303.
- Chiò, A., G. Logroscino, B. Traynor, J. Collins, J. Simeone, L. Goldstein, and L. White. 2013. "Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature." *Neuroepidemiology* 41: 118–30. Review.
- Chiossone, L., R. Conte, G. M. Spaggiari, M. Serra, C. Romei, F. Bellora, F. Becchetti, A. Andaloro, L. Moretta, and C. Bottino. 2016. "Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses." *Stem Cells* 34: 1909–21.
- Choi, H., R. H. Lee, N. Bazhanov, J. Y. Oh, D. J. Prockop, A.J. Friedenstein, JF. Gorskaja, et al. 2011. "Anti-Inflammatory Protein TSG-6 Secreted by Activated MSCs Attenuates Zymosan-Induced Mouse Peritonitis by Decreasing TLR2/NF- κ B Signaling in Resident Macrophages." *Blood* 118: 330–38.
- Jacobs, S. A., V. D. Roobrouck, C. M. Verfaillie, and S. W. Van Gool. 2013. "Immunological Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells and Multipotent Adult Progenitor Cells." *Immunology and Cell Biology* 91: 32–39. Review.
- Jafarian, A., M. Taghikhani, S. Abroun, Z. Pourpak, A. Allahverdi, and M. Soleimani. 2014. "Generation of High-Yield Insulin Producing Cells from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Molecular Biology Reports* 41: 4783–94.
- Javorkova, E., P. Trosan, A. Zajicova, M. Krulova, M. Hajkova, and V. Holan. 2014. "Modulation of the Early Inflammatory Microenvironment in the Alkali-Burned Eye by Systemically Administered Interferon- γ -Treated Mesenchymal Stromal Cells." *Stem Cells and Development* 23: 2490–2500.
- Jeong, S.-G., T. Ohn, S. H. Kim, and G.-W. Cho. 2013. "Valproic Acid Promotes Neuronal Differentiation by Induction of Neuroprogenitors in Human Bone-Marrow Mesenchymal Stromal Cells." *Neuroscience Letters* 554: 22–27.
- Joe, I.-S., S.-G. Jeong, and G.-W. Cho. 2015. "Resveratrol-Induced SIRT1 Activation Promotes Neuronal Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Neuroscience Letters* 584: 97–102.

- Karussis, D., C. Karageorgiou, A. Vaknin-Dembinsky, B. Gowda-Kurkalli, J. M. Gomori, I. Kassis, J. W. M. Bulte, et al. 2011. "Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Archives of Neurology* 67: 1187–94.
- Kato, S. 2008. "Amyotrophic Lateral Sclerosis Models and Human Neuropathology: Similarities and Differences." *Acta Neuropathologica* 115: 97–114.
- Kim, H., H. Y. Kim, M. R. Choi, S. Hwang, K. H. Nam, H. Ch. Kim, J. S. Han, K. S. Kim, Hyun Soo Yoon, and Seung H. Kim. 2010. "Dose-Dependent Efficacy of ALS-Human Mesenchymal Stem Cells Transplantation into Cisterna Magna in SOD1-G93A ALS Mice." *Neuroscience Letters* 468: 190–94.
- Kim, H. Y., H. Kim, K.-W. Oh, S.-I. Oh, S.-H. Koh, W. Baik, M. Y. Noh, Kyung Suk Kim, and Seung Hyun Kim. 2014. "Biological Markers of Mesenchymal Stromal Cells as Predictors of Response to Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis; an Investigator-Initiated Trial and in Vivo Study." *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 2724–31.
- Kota, D. J., L. L. Wiggins, N. Yoon, and R. H. Lee. 2013. "TSG-6 Produced by hMSCs Delays the Onset of Autoimmune Diabetes by Suppressing Th1 Development and Enhancing Tolerogenicity." *Diabetes* 62: 2048–58.
- Krampera, M., L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, V. Santarlasci, et al. 2006. "Role for Interferon-Gamma in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Stem Cells* 24: 386–98.
- Kwon, M.-S., M.-Y. Noh, K.-W. Oh, K.-A. Cho, B.-Y. Kang, K.-S. Kim, Y.-S. Kim, and Seung H Kim. 2014. "The Immunomodulatory Effects of Human Mesenchymal Stem Cells on Peripheral Blood Mononuclear Cells in ALS Patients." *Journal of Neurochemistry* 131: 206–18.
- Larghero, J., D. Farge, A. Braccini, S. Lecourt, A. Scherberich, E. Foïs, F. Verrecchia, et al. 2008. "Phenotypical and Functional Characteristics of in Vitro Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Patients with Systemic Sclerosis." *Annals of the Rheumatic Diseases* 67: 443–49.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, C. Götherström, C. Seidel, B. Sundberg, M. Sundin, K. Rosendahl, C. Tammik, and O. Ringdén. 2004. "Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes." *Scandinavian Journal of Immunology* 60: 307–15.
- Lee, R. H., A. A. Pulin, M. J. Seo, D. J. Kota, J. Ylostalo, B. L. Larson, L. Semprun-prieto, P. Delafontaine, and J. Darwin. 2014. "Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice Because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-Inflammatory Protein TSG-6." *Cell Stem Cell* 5: 54–63.
- Li, M. O., Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A.-K. L. Robertson, and R. A. Flavell. 2006. "Transforming Growth Factor-Beta Regulation of Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 24: 99–146. Review.
- Li, M., X. Sun, X. Kuang, Y. Liao, H. Li, and D. Luo. 2014. "Mesenchymal Stem Cells Suppress CD8+ T Cell-Mediated Activation by Suppressing Natural Killer Group 2, Member D Protein Receptor Expression and Secretion of Prostaglandin E2, Indoleamine 2, 3-Dioxygenase and Transforming Growth Factor-B." *Clinical and Experimental Immunology* 178: 516–24.

- Liu, Y., L. Wang, T. Kikuri, K. Akiyama, Ch. Chen, X. Xu, R. Yang, W. Chen, S. Wang, and S. Shi. 2012. "Mesenchymal Stem Cell-Based Tissue Regeneration Is Governed by Recipient T Lymphocyte via IFN- γ and TNF- α ." *Nature Medicine* 17: 1594–1601.
- Marconi, S., M. Bonaconsa, I. Scambi, G. M. Squintani, W. Rui, E. Turano, D. Ungaro, et al. 2013. "Systemic Treatment with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Clinical and Pathological Features in the Amyotrophic Lateral Sclerosis Murine Model." *Neuroscience* 248: 333–43.
- Mazzanti, B., A. Aldinucci, T. Biagioli, A. Barilaro, S. Urbani, S. Dal Pozzo, M. P. Amato, et al. 2008. "Differences in Mesenchymal Stem Cell Cytokine Profiles between MS Patients and Healthy Donors: Implication for Assessment of Disease Activity and Treatment." *Journal of Neuroimmunology* 199: 142–50.
- Mazzini, L., K. Mareschi, I. Ferrero, M. Miglioretti, A. Stecco, S. Servo, A. Carriero, F. Monaco, and F. Fagioli. 2012. "Mesenchymal Stromal Cell Transplantation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Long-Term Safety Study." *Cytotherapy* 14: 56–60.
- Mazzini, L., K. Mareschi, I. Ferrero, E. Vassallo, G. Oliveri, N. Nasuelli, G. D. Oggioni, L. Testa, and F. Fagioli. 2008. "Stem Cell Treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of the Neurological Sciences* 265: 78–83.
- Mccombe, P. A., and R. D. Henderson. 2010. "Effects of Gender in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Gender Medicine* 7: 557–70.
- McKarns, S. C., R. H. Schwartz, and N. E. Kaminski. 2004. "Smad3 Is Essential for TGF-Beta 1 to Suppress IL-2 Production and TCR-Induced Proliferation, but Not IL-2-Induced Proliferation." *Journal of Immunology* 172: 4275–84.
- Michelucci, A., T. Heurtaux, L. Grandbarbe, E. Morga, and P. Heuschling. 2009. "Characterization of the Microglial Phenotype under Specific pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Conditions: Effects of Oligomeric and Fibrillar Amyloid- β ." *Journal of Neuroimmunology* 210: 3–12.
- Molendijk, I., B. A. Bonsing, H. Roelofs, K. C. M. J. Peeters, M. N. J. M. Wasser, G. Dijkstra, C. J. van der Woude, et al. 2015. "Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease." *Gastroenterology* 149: 918–27.
- Naaldijk, Y., A. A. Johnson, S. Ishak, H. J. Meisel, Ch. Hohaus, and A. Stolzing. 2015. "Migrational Changes of Mesenchymal Stem Cells in Response to Cytokines, Growth Factors, Hypoxia, and Aging." *Experimental Cell Research* 338: 97–104.
- Nakagawa, T., M. Tsuruoka, H. Ogura, Y. Okuyama, Y. Arima, T. Hirano, and M. Murakami. 2009. "IL-6 Positively Regulates Foxp3+CD8+ T Cells in Vivo." *International Immunology* 22: 129–39.
- Niebroj-Dobosz, I., D. Dziewulska, and P. Janik. 2006. "Auto-Antibodies against Proteins of Spinal Cord Cells in Cerebrospinal Fluid of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)." *Folia Neuropathologica* 44: 191–96.
- Oh, J. Y., G. W. Roddy, H. Choi, R. H. Lee, J. H. Ylostalo, R. H. Rosa, and D. J. Prockop. 2010. "Anti-Inflammatory Protein TSG-6 Reduces Inflammatory Damage to the Cornea Following Chemical and Mechanical Injury." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 16875–80.

- Oh, K.-W., Ch. Moon, H. Y. Kim, S.-I. Oh, J. Park, J. H. Lee, I. Y. Chang, K. S. Kim, and S. H. Kim. 2015. "Phase I Trial of Repeated Intrathecal Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Stem Cells Translational Medicine* 4: 590–97.
- Park, M. J., J. S. Shin, Y. H. Kim, S. H. Hong, S. H. Yang, J. Y. Shin, S. Y. Kim, B. Kim, J. S. Kim, and C. G. Park. 2011. "Murine Mesenchymal Stem Cells Suppress T Lymphocyte Activation Through IL-2 Receptor α (CD25) Cleavage by Producing Matrix Metalloproteinases." *Stem Cell Reviews and Reports* 7: 381–93.
- Petrou, P., Y. Gothelf, Z. Argov, M. Gotkine, Y. S. Levy, I. Kassis, A. Vaknin-Dembinsky, et al. 2016. "Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials." *JAMA Neurology* 73: 337–44.
- Philips, T., A. Bento-Abreu, A. Nonneman, W. Haack, K. Staats, V. Geelen, N. Hersmus, et al. 2013. "Oligodendrocyte Dysfunction in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Brain: A Journal of Neurology* 136: 471–82. Review.
- Ramasamy, R., C. K. Tong, H. F. Seow, S. Vidyadaran, and F. Dazzi. 2008. "The Immunosuppressive Effects of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Target T Cell Proliferation but Not Its Effector Function." *Cellular Immunology* 251: 131–36.
- Reinders, M. E. J., J. W. de Fijter, H. Roelofs, I. M. Bajema, D. K. de Vries, A. F. Schaapherder, F. H. J. Claas, et al. 2013. "Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Allograft Rejection after Renal Transplantation: Results of a Phase I Study." *Stem Cells Translational Medicine* 2: 107–11.
- Rodrigues, M. C. O., J. C. Voltarelli, P. R. Sanberg, C. V. Borlongan, and S. Garbuzova-Davis. 2012. "Immunological Aspects in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Translational Stroke Research* 3: 331–40 Review.
- Romieu-Mourez, R., M. François, M.-N. Boivin, M. Bouchentouf, D. E. Spaner, and J. Galipeau. 2009. "Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype." *Journal of Immunology* 182: 7963–73.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John. 2011. "The pro- and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813: 878–88.
- Sica, A., and A. Mantovani. 2012. "Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas." *Journal of Clinical Investigation* 122: 787–95.
- Sohni, A., and C. M. Verfaillie. 2013. "Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking." *Stem Cells International* 2013: 1–8. Review.
- Spaggiari, G. M., H. Abdelrazik, F. Becchetti, and L. Moretta. 2009. "MSCs Inhibit Monocyte-Derived DC Maturation and Function by Selectively Interfering with the Generation of Immature DCs: Central Role of MSC-Derived Prostaglandin E 2." *Hematopoiesis and Stem Cells* 113: 6576–83.

- Sta, M., R.M.R. Sylva-Steenland, M. Casula, J.M.B.V. de Jong, D. Troost, E. Aronica, and F. Baas. 2011. "Innate and Adaptive Immunity in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Evidence of Complement Activation." *Neurobiology of Disease* 42: 211–20.
- Sun, Y., W. Deng, L. Geng, L. Zhang, R. Liu, W. Chen, G. Yao, et al. 2015. "Mesenchymal Stem Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis Display Impaired Function in Inhibiting Th17 Cells." *Journal of Immunology Research* 2015: 1–13.
- Svobodova, E., M. Krulova, A. Zajicova, K. Pokorna, J. Prochazkova, P. Trosan, and V. Holan. 2012. "The Role of Mouse Mesenchymal Stem Cells in Differentiation of Naive T-Cells into Anti-Inflammatory Regulatory T-Cell or Proinflammatory Helper T-Cell 17 Population." *Stem Cells and Development* 21: 901–10.
- Tang, Y., and W. Le. 2016. "Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases." *Molecular Neurobiology* 53: 1181–94. Review.
- Tang, Y., H. Xie, J. Chen, L. Geng, H. Chen, X. Li, Y. Hou, et al. 2013. "Activated NF- κ B in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients Inhibits Osteogenic Differentiation through Downregulating Smad Signaling." *Stem Cells and Development* 22: 668–78.
- Tatara, R., K. Ozaki, Y. Kikuchi, K. Hatanaka, I. Oh, A. Meguro, H. Matsu, K. Sato, and K. Ozawa. 2011. "Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Th17 but Not Regulatory T-Cell Differentiation." *Cytotherapy* 13: 686–94.
- Teo, G. S. L., J. A. Ankrum, R. Martinelli, S. E. Boetto, K. Simms, T. E. Sciuto, A. M. Dvorak, J. M. Karp, and Ch. V. Carman. 2012. "Mesenchymal Stem Cells Transmigrate between and Directly through Tumor Necrosis Factor- α -Activated Endothelial Cells via Both Leukocyte-like and Novel Mechanisms." *Stem Cells* 30: 2472–86.
- Teo, G. S. L., Z. Yang, Ch. V. Caran, J. M. Karp, and Ch. P. Lin. 2015. "Intravital Imaging of Mesenchymal Stem Cell Trafficking and Association With Platelets and." *Stem Cells* 33: 265–77.
- Tse, W. T., J. D. Pendleton, W. M. Beyer, M. C. Egalka, and E. C. Guinan. 2003. "Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation by Human Marrow Stromal Cells: Implications in Transplantation." *Transplantation* 75: 389–97.
- Uccelli, A., M. Milanese, M. C. Principato, S. Morando, T. Bonifacino, L. Vergani, D. Giunti, et al. 2012. "Intravenous Mesenchymal Stem Cells Improve Survival and Motor Function in Experimental Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Molecular Medicine* 18: 794–804.
- Vercelli, A., O. M. Mereuta, D. Garbossa, G. Muraca, K. Mareschi, D. Rustichelli, I. Ferrero, L. Mazzini, E. Madon, and F. Fagioli. 2008. "Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation Extends Survival, Improves Motor Performance and Decreases Neuroinflammation in Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Neurobiology of Disease* 31: 395–405.
- Wagner, M. L., and B. E. Landis. 1997. "Riluzole: A New Agent for Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Annals of Pharmacotherapy* 31: 738–44. Review.
- Wahl, S. M., J. Swisher, N. McCartney-Francis, and W. Chen. 2004. "TGF-Beta : The Perpetrator of Immune Suppression by Regulatory T Cells and Suicidal T Cells." *Journal of Leukocyte Biology* 76: 15–24.

- Wang, C., H. Zhu, Z. Sun, Z. Xiang, Y. Ge, C. Ni, Z. Luo, W. Qian, and X. Han. 2014. "Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Epithelial Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Repairs Bleomycin-Induced Lung Injury." *American Journal of Physiology* 307: 234–44.
- Wang, Y., W. Fu, S. Zhang, X. He, Z. Liu, D. Gao, and T. Xu. 2014. "CXCR-7 Receptor Promotes SDF-1 α -Induced Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Transient Cerebral Ischemia/reperfusion Rat Hippocampus." *Brain Research* 1575: 78–86.
- Watanabe, J., A. K. Shetty, B. Hattiangady, D.-K. Kim, J. E. Foraker, H. Nishida, and D. J. Prockop. 2011. "Administration of TSG-6 Improves Memory after Traumatic Brain Injury in Mice." *Neurobiology of Disease* 51: 1291–1301.
- Waterman, R. S., S. L. Tomchuck, S. L. Henkle, and A. M. Betancourt. 2010. "A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype." *PLoS ONE* 5: e10088.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, et al. 2007. "Development, Cytokine Profile and Function of Human Interleukin 17-Producing Helper T Cells." *Nature Immunology* 8: 950–57.
- Wisniewski, H.-G., J. Vilček, H. Baumann, J. Gauldie, M. Krönke, S. Schütze, P. Scheurich, et al. 1997. "TSG-6: An IL-1 /TNF-Inducible Protein with Anti-Inflammatory Activity." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8: 143–56. Review.
- Xin, J., D. Wainwright, N. Mesnard, C. J. Serpe, V. M. Sanders, and K. J. Jones. 2011. "IL-10 within the CNS Is Necessary for CD4+ T Cells to Mediate Neuroprotection." *Brain, Behavior, and Immunity* 25: 820–29.
- Xing, Z., J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X.-F. Lei, and M. K. Achong. 1998. "IL-6 Is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses." *Journal of Clinical Investigation* 101: 311–20.
- Yan, Z., Y. Zhuansun, G. Liu, R. Chen, J. Li, and P. Ran. 2014. "Mesenchymal Stem Cells Suppress T Cells by Inducing Apoptosis and through PD-1/B7-H1 Interactions." *Immunology Letters* 162: 248–55.
- Yoshimura, A., and G. Muto. 2011. "TGF- β Function in Immune Suppression." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 350: 127–47. Review.
- Zanier, E. R., F. Pischiutta, L. Riganti, F. Marchesi, E. Turola, S. Fumagalli, C. Perego, et al. 2014. "Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Drive Protective M2 Microglia Polarization After Brain Trauma." *Neurotherapeutics* 11: 679–95.
- Zeng, X., X.-Ch. Qiu, Y.-H. Ma, J.-J. Duan, Y.-F. Chen, H.-Y. Gu, J.-M. Wang, et al. 2015. "Integration of Donor Mesenchymal Stem Cell-Derived Neuron-like Cells into Host Neural Network after Rat Spinal Cord Transection." *Biomaterials* 53: 184–201.
- Zhao, C.-P., C. Zhang, S.-N. Zhou, Y.-M. Xie, Y.-H. Wang, H. Huang, Y.-C. Shang, et al. 2007. "Human Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate the Phenotype of SOD1-G93A ALS Mice." *Cytotherapy* 9: 414–26.
- Zhao, K., R. Lou, F. Huang, Y. Peng, Z. Jiang, K. Huang, X. Wu, et al. 2015. "Immunomodulation Effects of Mesenchymal Stromal Cells on Acute Graft-versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 21: 97–104.

- Zhao, W., D. R. Beers, and S. H. Appel. 2013. "Immune-Mediated Mechanisms in the Pathoprogession of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 8: 888–99. Review.
- Zheng, G., Y. Liu, Q. Jing, and L. Zhang. 2015. "Differentiation of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocytes in Vitro." *Bio-Medical Materials and Engineering* 25: 145–57.