

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Kateřina Palacká

**Imunomodulační a regenerativní potenciál mezenchymálních kmenových
buněk v léčbě degenerativního poškození sítnice u myši**

**Immunomodulatory and regenerative potential of mesenchymal stem cells
in the treatment of degenerative retinal disorders in mice**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Barbora Heřmánková, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

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

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Barboře Heřmánkové, Ph.D. za věnovaný čas, ochotu a pomoc při psaní mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za poskytnuté rady a trpělivost. Ráda bych také poděkovala ostatním členům Oddělení transplantační imunologie za veškerou pomoc, a své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Degenerativní onemocnění představují sítnice hlavní příčinu ztráty zraku u dospělých pacientů. V rozvoji těchto onemocnění hraje důležitou roli postupné odumírání buněk sítnice a nežádoucí zánětlivá reakce, která vede k produkci celé řady cytokinů, tvorbě inflamazómu, zvýšené angiogenezi a vzniku jizev. Tyto patologické stavy mají za následek nevratnou degeneraci buněk sítnice. Poškozeny jsou především buňky epiteliální pigmentové vrstvy, fotoreceptory a gangliové buňky. Dostupné léčebné postupy jsou v současné době velmi omezené a účinné pouze v počátečním stádiu onemocnění. Perspektivní možností by proto mohlo být využití buněčné terapie založené na aplikaci kmenových buněk. Pro terapeutické účely je možné využít mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells), které mohou být izolovány například z kostní dřeně nebo tukové tkáně. MSC jsou schopné produkce celé řady neuroprotektivních faktorů, diferenciací, a zároveň mohou regulovat imunitní odpověď.

V této práci byl testován terapeutický potenciál lokálně podaných MSC na buňky poškozené sítnice v experimentálním modelu degenerace sítnice. Zaměřili jsme se především na protektivní působení MSC na fotoreceptory, na regulaci lokální infiltrace buňkami imunitního systému a na expresi genů pro cytokiny účastnící se zánětu. V *in vitro* modelu byl studován vliv MSC na expresi genů pro prozánětlivé faktory u buněk poškozené sítnice a na regulaci apoptózy. Testováno bylo také parakrinní působení MSC na degenerovanou sítnici a efekt vybraných cytokinů, které jsou MSC produkovány. Naše výsledky ukazují, že MSC mohou působit protektivně na buňky sítnice, inhibovat u nich expresi genů pro prozánětlivé faktory a snižovat jejich apoptózu. Regulace imunitní odpovědi v sítnici může být zajištěna také pomocí parakrinního působení MSC.

Aplikace MSC by tak mohla být vhodnou léčbou pro doposud neléčitelné onemocnění sítnice.

Klíčová slova: Degenerativní onemocnění sítnice, mezenchymální kmenové buňky, regulace imunitní odpovědi, neuroprotektivní faktory

Abstract

Retinal degenerative diseases are the leading cause of vision loss in adult patients. Important roles in the development of these types of disease play gradual death of retinal cells and an inflammatory reaction that leads to the production of cytokines, formation of inflammasome, increased angiogenesis and scar formation. These pathologies result in irreversible degeneration of retinal cells. Retinal pigment epithelium cells, photoreceptors and ganglion cells are the most frequently damaged cell types in these conditions. The available treatments are currently very limited and effective only at the early stages of the disease. Therefore, the use of stem cell-based therapy could be a promising option. For therapeutic purposes it would be possible to use mesenchymal stem cells (MSCs) which may be isolated for example from bone marrow or adipose tissue. MSCs are capable of production of neuroprotective factors, differentiation into the variety of cell types and regulation of immune response.

In this study we tested the therapeutic potential of MSC administered locally to the damaged retina in an experimental model of retinal degeneration. We focused on the protective effect of MSCs on photoreceptor cells, regulation of the local immune response and expression of genes for cytokines involved in inflammation *in vivo*. The effect of MSCs on expression of genes for proinflammatory factors in damaged retinal cells and on the regulation of apoptosis was studied *in vitro*. We also determined the paracrine effect of MSCs on the degenerated retina and the effect of selected cytokines that are produced by MSCs. Our results indicate that MSCs can protect retinal cells, reduce the expression of genes for proinflammatory factors and decrease apoptosis. Regulation of immune response in the retinal cells may be also mediated by the paracrine effect of MSCs.

Application of MSC could therefore be an appropriate and perspective treatment for currently untreatable diseases of the retina.

Key words: Degenerative retinal diseases, mesenchymal stem cells, regulation of the immune response, neuroprotective factors

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
1. Seznam zkratk.....	8
2. Úvod.....	10
3. Cíl práce.....	11
4. Literární přehled.....	12
4.1. Degenerativní onemocnění sítnice.....	12
4.2. Experimentální model farmakologicky navozeného poškození sítnice.....	14
4.2.1. Působení NaIO ₃ na buňky sítnice <i>in vivo</i>	14
4.2.2. NaIO ₃ model pro studium degenerativních onemocnění sítnice.....	16
4.2.3. Působení NaIO ₃ na buňky sítnice <i>in vitro</i>	16
4.3. Kmenové buňky.....	17
4.3.1. MSC.....	17
4.4. Využití MSC pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice.....	20
4.4.1. Migrace a přežívání MSC v místě poškození.....	21
4.4.2. Diferenciace MSC na buňky exprimující znaky buněk sítnice.....	22
4.4.3. Regulace imunitní odpovědi v sítnici pomocí MSC.....	23
4.4.4. Parakrinní působení MSC na buňky sítnice.....	23
4.4.5. Využití MSC pro léčbu sítnice na modelu NaIO ₃	25
4.5. Příklady klinických studií.....	26
5. Metody.....	27
5.1. Zvířata.....	27
5.2. Media a roztoky.....	27
5.3. Technické vybavení.....	27
5.4. Použitý software.....	28
5.5. Izolace, kultivace a separace MSC.....	28
5.6. Model poškození sítnice <i>in vivo</i>	29
5.7. Lokální aplikace MSC.....	29
5.8. Odběr explantátů sítnic.....	30
5.9. Model poškození sítnice <i>in vitro</i>	30
5.10. Kultivace sítnice a zadního segmentu oka.....	30
5.11. Kultivace zadního segmentu oka v přítomnosti NaIO ₃ a se supernatantem z MSC nebo vybranými cytokiny.....	31
5.12. Izolace mRNA.....	31
5.13. Reverzní transkripce.....	32

5.14.	PCR.....	32
5.15.	Test metabolické aktivity pomocí WST-1.....	34
5.16.	ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	34
5.17.	Příprava suspenze buněk sítnice pro průtokovou cytometrii.....	35
5.18.	Průtoková cytometrie.....	35
5.19.	Statistická analýza.....	38
6.	Výsledky.....	39
6.1.	Charakteristika použitých MSC.....	39
6.1.1.	Fenotypová charakterizace.....	39
6.1.2.	Expresí genů pro imunomodulační a růstové faktory v nestimulovaných a stimulovaných MSC.....	40
6.2.	Vliv cytokinů na expresi genů pro prozánětlivé molekuly v explantátech sítnice.....	41
6.3.	Model poškození sítnice podáním NaIO ₃	42
6.3.1.	Patologické změny v sítnici po aplikaci NaIO ₃	42
6.3.2.	Působení NaIO ₃ na buňky sítnice <i>in vitro</i>	44
6.4.	Protektivní účinek MSC na neuroretinu poškozenou aplikací NaIO ₃ <i>in vivo</i>	46
6.4.1.	Lokální aplikace MSC.....	46
6.4.2.	Kultivace poškozené neuroretiny v přítomnosti MSC <i>in vitro</i>	47
6.5.	Protektivní účinek MSC na zadní segment kultivovaný v přítomnosti NaIO ₃ <i>in vitro</i>	49
6.5.1.	Vliv MSC a supernatantů na expresi genů při kultivaci zadního segmentu v přítomnosti NaIO ₃	49
6.5.2.	Vliv cytokinů produkovaných MSC na expresi genů při kultivaci zadního segmentu v přítomnosti NaIO ₃	51
7.	Diskuze.....	53
8.	Závěr.....	58
9.	Seznam literatury.....	60

1. Seznam použitých zkratek

AMD (age-related macular degeneration, věkem podmíněná makulární degenerace)

APC (allophycocyanine, alofykocyanin)

Bax (Bcl2-associated X protein, Bcl2-asociovaný X protein)

BDNF (brain-derived neurotrophic factor, protein pro růst mozkových buněk)

CD (cluster of differentiation, diferenciační antigeny)

Cox-2 (cyklooxygenasa-2, cyklooxygenáza-2)

RLBP (retinaldehyde-binding protein, protein vázající kyselinu retinovou)

DC (dendritic cell, dendritické buňky)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)

DR (diabetická retinopatie)

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

ESC (embryonal stem cell, embryonální kmenové buňky)

FACS (fluorescence activated cell sorting, fluorescencí aktivované třídění buněk)

FGF (fibroblast growth factor, růstový faktor pro fibroblasty)

FITC (fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothiokyanát)

GAPDH (glyceraldehyd dehydrogenáza)

GFP (green fluorescence protein, zelený fluorescenční protein)

GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor, neurotrofický faktor z gliální buněčné linie)

HGF (hepatocyte growth factor, růstový faktor pro hepatocyty)

HMGB-1 (high-mobility group box 1)

HO-1 (hemoxygenáza-1)

ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1, mezibuněčná adhezivní molekula 1)

IDO (indoleamin 2,3-dioxygenase, indoleamin 2,3-dioxygenáza)

IL (interleukin)

IFN- γ (interferon- γ)

iNOS (inducible nitric oxide synthase, inducibilní syntáza oxidu dusnatého)

i.p. (intraperitoneální podání)

iPSC (induced pluripotent stem cell, indukované pluripotentní kmenové buňky)

LPS (lipopolysacharid)

mAb (monoclonal antibody, monoklonální protilátka)

MACS (magnetic activated cell sorting, magneticky aktivované třídění buněk)

MHC (major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex)

MSC (mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky)

NaIO₃ (jodičnan sodný)

NGF (nerve growth factor, nervový růstový faktor)

NK (natural killers, přirození zabíječi)

NMDA (N-methyl-D-aspartat)

NO (oxid dusnatý)

PD-L1 (programmed death ligand-1, ligand programované buněčné smrti)

PE (phycoerythrin, fykoerytrin)

PGE₂ (prostaglandin E₂)

ROS (reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku)

RT-PCR (real-time polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

RP (retinitis pigmentosa)

RPE (retinal pigmented epithelium, retinální pigmentový epitel)

TGF-β (transforming growth factor-β, transformující růstový faktor-β)

TLR (Toll like receptor)

TNF-α (tumor necrosis factor-α, faktor nekrotizující nádory α)

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)

VCAM-1, (vascular cell adhesion molecule-1, cévní adhezivní molekula 1)

VEGF (vascular endothelial growth factor, vaskulární endotelový růstový faktor)

2. Úvod

Degenerativní onemocnění sítnice, jako je diabetická retinopatie (DR, diabetic retinopathy), věkem podmíněná makulární degenerace (AMD, age-related macular degeneration), retinitis pigmentosa (RP) nebo glaukom, představují hlavní příčinu zhoršení kvality vidění až úplné ztráty zraku. U pacientů dochází k nevratnému poškození buněk sítnice a tvorbě nových cév, které následně mohou prosakovat, vytvářet otok a krvácení sítnice a také přispět k rozvoji nežádoucí lokální zánětlivé reakce, zvýšené produkci celé řady cytokinů, tvorbě inflamazómu a k infiltraci buněk imunitního systému do poškozené tkáně.

V současné době neexistuje pro tato onemocnění dostatečně účinná léčba. Používané léčebné postupy se zaměřují na snížení nežádoucí angiogeneze, případně využívají laser k ošetření poškozené sítnice. Jedná se však o prostředky, které nezastaví samotné onemocnění, ale pouze zmírní jeho průběh a projevy. Zmíněné léčebné postupy navíc nejsou vždy účinné, mohou být spojeny s dalšími komplikacemi a nemusí být vhodné pro všechny pacienty. Perspektivou pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice by tak mohla být buněčná terapie využívající mezenchymální kmenové buňky (MSC, mezenchymal stem cell).

MSC jsou buněčnou populací nacházející se téměř ve všech tkáních. Vzhledem ke svým imunomodulačním vlastnostem mohou polarizovat imunitní odpověď a potlačit nežádoucí zánětlivou reakci v tkáni. Dále produkují celou řadu růstových a neuroprotektivních faktorů, a tak mohou přispět k ochraně a regeneraci buněk. Důležitou vlastností MSC je také jejich schopnost diferenciaci v různé buněčné typy a v neposlední řadě také jejich schopnost migrace do místa poškození.

MSC byly již v několika pracích studovány pro svůj potenciál v léčbě degenerativních onemocnění sítnice. Jejich diferenciační vlastnosti by mohly pomoci při nahrazení buněk sítnice, které byly poškozeny, sekrece neuroprotektivních a růstových faktorů podpořit přežívání buněk a jejich regeneraci, produkce imunomodulačních molekul MSC může regulovat nežádoucí imunitní odpověď a infiltraci buněk imunitního systému do poškozeného oka. MSC jsou často izolovány z kostní dřeně nebo tukové tkáně, a tak by bylo možné využít jejich autologní transplantaci přímo od pacienta.

I přes řadu studií však stále nebyly zcela objasněny všechny mechanismy, kterými by MSC mohly působit na poškozené buňky sítnice, a proto je potřeba dalšího výzkumu.

3. Cíl práce

Aplikace MSC představuje perspektivní možnost v terapii doposud neléčitelných degenerativních onemocnění sítnice. Mechanizmy působení MSC na poškozené sítnicové buňky však stále nejsou objasněné. Cílem této práce je proto studium terapeutického potenciálu MSC v experimentálním modelu degenerace sítnice v *in vivo* a *in vitro* systému.

Ke studiu mechanismů byl použit model chemicky indukovaného poškození sítnice u myši. Pro testování účinku MSC izolovaných z kostní dřevě myši byly buňky aplikovány lokálně do sklivce a následně byl sledován efekt terapie na fotoreceptory a na regulaci imunitní odpovědi v buňkách sítnice. Práce byla dále zaměřena na studium *in vitro* působení MSC na poškozené explantáty sítnic a na možnosti parakrinního působení MSC na regulaci exprese genů pro prozánětlivé molekuly. Na závěr byl také zhodnocen potencionální vliv vybraných cytokinů, které jsou MSC produkovány, na buňky poškozené sítnice.

4. Literární přehled

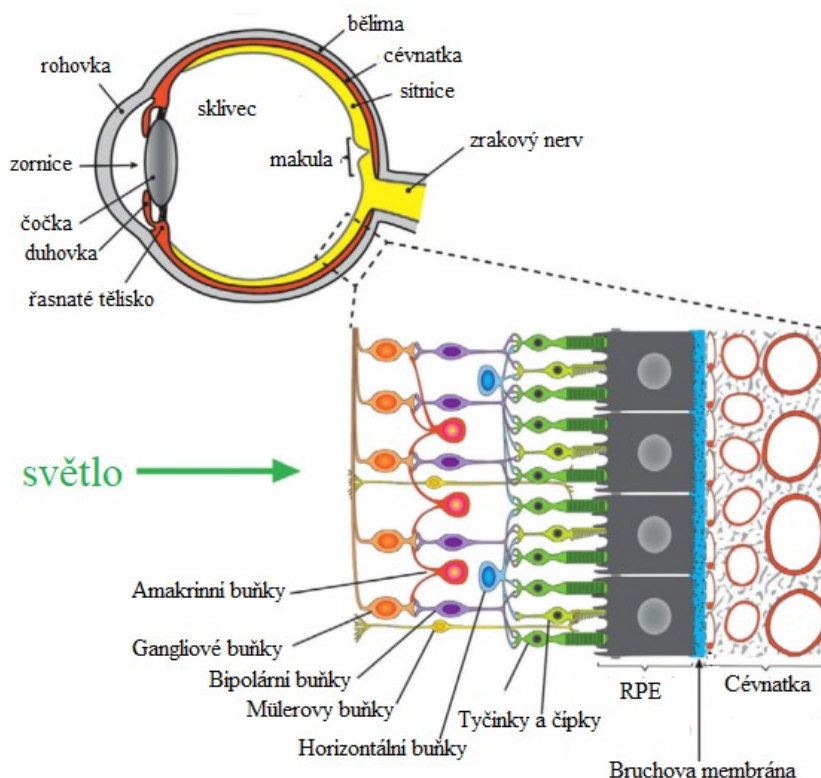
4.1. Degenerativní onemocnění sítnice

Sítnice je komplexní struktura složená z několika buněčných typů, které slouží ke zpracování světelných signálů. Neurální část sítnice zahrnuje gangliové buňky, Müllerovy buňky, amakrinní buňky, horizontální a bipolární buňky a fotoreceptory, které se dále dělí na tyčinky a čípky. Tyčinky jsou citlivější a zajišťují vidění v šeru. Čípky mají oproti tyčinkám slabší citlivost na světlo, je jich nižší počet a zajišťují barevné vidění. Fotoreceptory obsahují transmembránový protein rodopsin, který po absorpci světla spouští kaskádu vedoucí k depolarizaci nervových buněk sítnice. Vrstva epitelálních pigmentových buněk (RPE, retinal pigmented epithelium) je součástí hemoretinální bariéry a podílí se na udržení integrity a homeostázy sítnice a na jejím metabolismu. Nasedá na Bruchovu membránu, která dále přechází v cévnatku (**Obrázek 1**). Porušení kteréhokoliv z těchto typů buněk vede k poškození zraku až úplné ztrátě vidění (Hoon et al., 2014; Sundar et al., 2020).

Degenerativní onemocnění sítnice, při kterých dochází k porušení některé z těchto buněčných vrstev, představují v současné době hlavní příčinu ztráty zraku u dospělých pacientů. Mezi nejrozšířenější onemocnění tohoto typu se řadí především DR, RP, AMD a glaukom. U většiny pacientů jsou postiženy převážně RPE buňky a fotoreceptory, dochází ke zvýšené angiogenezi, oxidativnímu stresu, zánětu a následnému zhoršení nebo až úplné ztrátě zraku (Ludwig et al., 2019). Ukazuje se, že nežádoucí zánětlivá reakce hraje v rozvoji degenerativních onemocnění sítnice důležitou roli. Dochází k aktivaci přítomných mikroglíí a migraci makrofágů, které mohou mimo jiné spustit v sítnici tvorbu inflamazómu, což následně vede ke zvýšené produkci interleukinu-1 α (IL-1 α) a IL-1 β . IL-1 β je dále produkován především makrofágy, které se infiltrovaly do místa poškození. Při degenerativních onemocněních sítnice byly u pacientů zaznamenány lokální zvýšené hladiny i dalších cytokinů z rodiny IL-1, jako je například IL-18, IL-1Ra a IL-36Ra (Wooff et al., 2019).

Nejčastější příčinou poškození a ztráty zraku je AMD, která se vyskytuje ve dvou formách – suché a vlhké. U suché formy dochází postupně ke ztrátám buněk fotoreceptorů a RPE vrstvy, zatímco vlhká forma onemocnění je charakterizována především rychle postupující neovaskularizací. Během AMD dochází k poškození hemoretinální bariéry sítnice, která zajišťuje za fyziologických podmínek homeostázy oka. Oproti zdravým jedincům dochází k navýšení hladiny albuminu, fibrogenu, imunoglobulinu G a složky komplementu C9. U

pacientů byly zaznamenány také zvýšené hladiny cytokinů, jako jsou například IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-13 a IL-17 (Nassar et al., 2014; Schultz et al., 2019).



Obrázek 1. Anatomie oka a základní struktura sítnice (převzato a upraveno z Caceres and Rodriguez-Boulan, 2019)

DR je jedním z doprovodných onemocnění diabetů 1. i 2. typu. Jedná se o jednu z nejčastějších příčin poškození a následné ztráty zraku ve vyspělých zemích. Onemocnění může být rozděleno na neproliferativní DR a proliferativní DR, při které dochází v postiženém oku k tvorbě nových kapilár. Jednou z příčin poškození sítnice u DR je hyperglykémie, která je následně spojena s oxidativním stresem a zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslík (ROS, reactive oxygen species), aktivací proteinkinázy C a polyolové a hexosaminové dráhy (Heng et al., 2013). U pacientů s proliferativní DR byly pozorovány zvýšené hladiny IL-6, IL-8, IL-10, destičkového růstového faktoru a vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor) oproti zdravým jedincům (Mallmann and Canani, 2018).

RP je soubor geneticky podmíněných onemocnění, při kterých dochází v sítnici k postupné degeneraci tyčinek a následně také čípků, což vede k poškození periferního vidění až úplné ztrátě zraku. Tento typ onemocnění může být způsoben několika možnými mutacemi, včetně

mutace v genu pro rodopsin. Některé studie poukazují na to, že velkou roli v rozvoji RP hraje inflamazóm a produkce IL-1 β (Wooff et al., 2019).

Glaukom je degenerativní onemocnění sítnice způsobené především zvýšeným nitroočním tlakem, což vede k poškození gangliových buněk a optického nervu. U pacientů často nejsou během rozvoje onemocnění pozorovatelné žádné příznaky, dokud nedojde k samotné degeneraci nervových buněk a poškození vidění (Weinreb et al., 2015).

Současná léčba degenerativních onemocnění sítnice je velmi omezená a většinou účinná jen v určitém stádiu onemocnění. Jednou z možností je využití laserové terapie, která však nevyлéčí samotné onemocnění, ale pouze zpomalí jeho postup a stabilizuje jeho průběh. Další možností je terapie zaměřující se na blokování VEGF a tím snížení angiogeneze a tvorby jizev. I tady dochází pouze ke zpomalení onemocnění. Protilátka proti VEGF je podávána lokálně a aplikace musí být opakovaná, a ne vždy je účinná. Navíc může docházet ke komplikacím spojeným s nežádoucím účinkem anti-VEGF protilátek na další orgány těla (Wilkinson-Berka et al., 2019).

4.2. Experimentální model farmakologicky navozeného poškození sítnice

Pro studium degenerativních onemocnění sítnice existuje několik experimentálních modelů využívající chemicky navozené poškození sítnicových buněk. Jednou z možností je například intravitreální podání N-methyl-D-asparatu (NMDA), který způsobuje *in vivo* apoptózu neuronů. Pro degeneraci fotoreceptorů může být lokálně podán chlorid kobaltnatý, případně nitroprusid sodný, který způsobí vazodilataci (Li et al., 2018; Niwa et al., 2016). V mnoha pracích využívanou látkou pro studium degenerativních onemocnění sítnice je také jodičnan sodný (NaIO₃), který je nejčastěji podáván systémově.

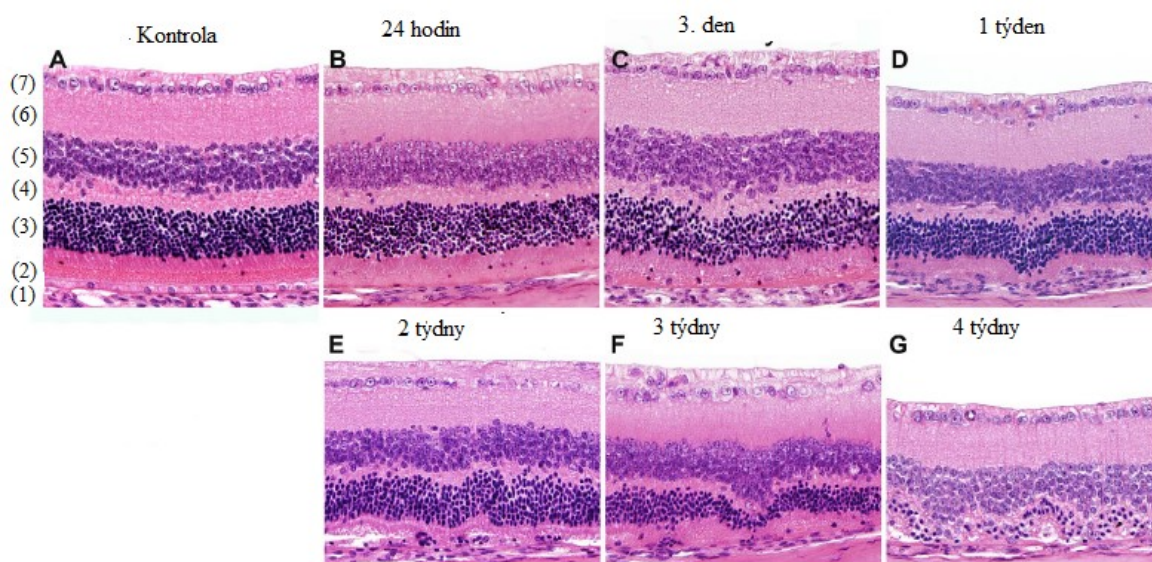
NaIO₃ je látka s oxidačními účinky, která specificky poškozuje buňky sítnice a způsobuje především degeneraci RPE buněk, což následně vede k narušení i dalších vrstev. Už nízké dávky, které jsou podány intraperitoneálně nebo intravenózně, způsobují po 24 h u myši zvýšenou tvorbu superoxidu v oblasti sítnice (Berkowitz et al., 2015). To dále může vést k postupnému poškození sítnicových buněk, migraci makrofágů do oblasti zadního segmentu oka a následné degeneraci sítnice.

4.2.1. Působení NaIO₃ na buňky sítnice *in vivo*

Intraperitoneální podání NaIO₃ v množství 50 mg/kg váhy způsobilo u myši už po 24 h od aplikace mírné změny ve struktuře sítnice, které byly pozorovány *in vivo* například pomocí

laserového oftalmologického zobrazovacího systému. Na histologických řezech pak bylo pozorováno porušení vrstvy RPE buněk. Během následujících dnů docházelo postupně ke zhoršení integrity sítnice a 4 týdny po aplikaci NaIO₃ došlo k silné degeneraci sítnice a ztrátě většiny fotoreceptorů (**Obrázek 2**). Dále zde došlo k významnému snížení exprese RPE-65 proteinu, který hraje důležitou roli v metabolismu vitamínu A, a ve zdravé sítnici je silně exprimován (Chowers et al., 2017).

Po 24 h od intravenózní aplikace NaIO₃ byla v sítnicích myší zaznamenána zvýšená exprese chemoatraktantu pro makrofágy a mezibuněčné adhezivní molekuly 1 (ICAM-1, intracellular adhesion molecule 1). Po 3 dnech došlo k nárůstu koncentrace IL-1β a IL-6 naznačující zvýšenou přítomnost makrofágů. Sedmý den pak byly viditelné buňky nesoucí znaky pro makrofágy naakumulované v oblasti RPE buněk (Moriguchi et al., 2018).



Obrázek 2. Působení NaIO₃ na buněčné vrstvy sítnice u kontrolní myši (A), a myši, kterým bylo podáno NaIO₃ 24 h (B), 3 dny (C), 1 týden (D), 2 týdny (E), 3 týdny (F) a 4 týdny (G) od aplikace. Zdola: vrstva RPE buněk (1), vrstva tyčinek a čípků (2), zevní jádrová membrána (3), zevní plexiformní vrstva (4), vnitřní jádrová membrána (5), vnitřní plexiformní vrstva (6), vrstva gangliových buněk (7). U myši došlo po intravitreálním podání NaIO₃ postupně k degeneraci a narušení jednotlivých buněčných vrstev (převzato a upraveno z Chowers et al., 2017).

Balmer et al. (2015) pomocí metody detekce apoptických DNA fragmentů TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) ukázali, že u myši po intravenózním podání NaIO₃ dochází k výskytu TUNEL-pozitivních buněk. Část TUNEL-

pozitivních buněk byla dále pozitivní také na kaspázu. Po podání chemikálie jsou jako první poškozeny především RPE buňky a až následně vrstva fotoreceptorů. U tyčinek a čípků dochází k nejsilnější degeneraci přibližně 3. den po aplikaci NaIO₃, kdy také dochází k migraci makrofágů do sítnice. Následně dochází ke snížení apoptózy a přibližně 7. den od podání dojde k ustálení probíhajícího poškození (Balmer et al., 2015; Kiuchi et al., 2002).

4.2.2. NaIO₃ model pro studium degenerativních onemocnění sítnice

Aplikace NaIO₃ byla použita v několika experimentech jako model především pro studium AMD, při které je u pacientů poškozená RPE vrstva, což následně vede k vytváření odpadních látek ve formě tzv. drúz. U sítnice poškozené systémovým podáním NaIO₃ byla pomocí metody polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR, real-time polymerase chain reaction) nalezena zvýšená exprese genů charakteristických pro AMD – *Htra3* a gen pro složku komplementu C3 (Moriguchi et al., 2018). Bhutto et al. (2018) dále ukázali, že subretinální aplikace NaIO₃ může způsobit ohraňené poškození RPE vrstvy sítnice, obklopené zdravou tkání. Tento způsob podání by tak mohl být vhodný například pro studium pozdního stádia suché formy AMD – tzv. geografické atrofie makuly.

4.2.3. Působení NaIO₃ na buňky sítnice *in vitro*

Efekt NaIO₃ na buňky RPE byl testován v několika studiích také *in vitro* s využitím buněčné linie ARPE-19. Jedná se o lidskou linii buněk exprimující specifické znaky RPE-65 a buněčný protein vázající kyselinu retinovou (RLBP, retinaldehyde-binding protein) používanou pro *in vitro* experimenty zabývající se sítnicí a její fyziologií. Kultivací ARPE-19 buněk v přítomnosti různých koncentrací NaIO₃ došlo u takto ovlivněných buněk ke zvýšené exprese cathepsinu b, Bcl2-asociovaného X proteinu (Bax, Bcl2-associated X protein) a naopak snížení exprese Bcl-2. Došlo také k nárůstu aktivity kaspáz 3 a 7 a kaspázy 1, která je součástí NLRP3 inflamazómu. Kultivace ARPE-19 buněk s NaIO₃ vedla ke zvýšení produkce IL-1 β a fosforylovaného transkripčního faktoru p65. Další studie ukázaly, že u ARPE-19 buněk dochází také k nekroptóze a uvolnění HMGB-1 (high-mobility group box 1) z jádra do cytoplazmy už po 4 hodinách od začátku kultivace s NaIO₃ (Hanus et al., 2016; Juel et al., 2013; Mao et al., 2018).

Využití chemického poškození sítnice pomocí NaIO₃ by tak mohlo být vhodným modelem pro výzkum využití buněčné terapie a aplikace kmenových buněk pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice.

4.3. Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou v posledních letech zkoumány pro možnosti využití v regenerativní medicíně. Jedná se o buněčnou populaci, která během dělení dává vznik nejen nové kmenové buňce, ale také buňce dceřiné, u které dochází k další diferenciaci. Vzhledem k nízké expresi molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, major histocompatibility complex) a produkci řady cytokinů a růstových faktorů, mají kmenové buňky imunomodulační a regenerativní vlastnosti. V některých případech mohou být kmenové buňky podány autologně přímo od pacienta.

Kmenové buňky můžeme rozdělit na embryonální kmenové buňky, (ESC, embryonal stem cell), indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC, induced pluripotent stem cell) a kmenové buňky z dospělého organismu (Mahla, 2016).

ESC se získávají z blastocysty zárodku a díky své pluripotenci se mohou diferencovat na různé buněčné typy. Jejich využití ale omezuje častá tvorba teratomů a etické problémy spojené s jejich izolací. iPSC jsou připravovány z dospělých buněk *in vitro* vnesením genů pro transkripční faktory *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* a *cMyc*. iPSC mohou být využívány jako autologní buňky přímo od pacienta. Na rozdíl od ESC nedochází k etickým problémům. Naopak nevýhodu aplikování iPSC je použití virových vektorů a možnost tvorby teratomů. Kmenové buňky dospělého organismu jsou přítomny téměř ve všech tkáních a slouží především k regeneraci a udržení homeostázy organismu. Řadí se mezi ně například hematopoetické kmenové buňky, spermatogenní kmenové buňky a také MSC (Kanji and Das, 2017; Ng et al., 2014; Zomer et al., 2015).

4.3.1. MSC

MSC jsou buněčnou populací nacházející se v téměř ve všech tkáních a pro lidské MSC byla Mezinárodní společností pro buněčnou terapii stanovena 3 základní kritéria. Prvním je exprese diferenciačních antigenů (CD, cluster of differentiation) CD73, CD90, CD105, a naopak absence hematopoetických znaků CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α a molekul MHC 2. třídy. Dále musí mít schopnost *in vitro* diferenciaci na adipocyty, chondroblasty a osteoblasty a za standartních kultivačních podmínek musí vykazovat adhezenci k plastovému povrchu (Dominici et al., 2006).

4.3.1.1. Diferenciační schopnosti MSC

MSC byly v posledních letech zvažovány pro terapeutické účely především kvůli schopnosti diferenciaci v rozdílné buněčné typy. Pro diferenciaci *in vitro* existuje několik protokolů využívající rozdílné rozpustné faktory, které mohou být upraveny v závislosti na zdroji buněk a jejich dalším využití. Kromě adipocytů, chondroblastů a osteoblastů je možné diferencovat MSC také například v buňky vykazující znaky pro buňky srdeční svaloviny, buňky hladkých svalů, neurony a mnohé další. Funkční vlastnosti takto diferencovaných buněk však stále nejsou přesně objasněny a je teda potřeba dalších studií (Fitzsimmons et al., 2018).

4.3.1.2. Migrační schopnosti MSC

MSC jsou dále schopny migrovat do místa poškození. Přesné mechanismy nebyly prozatím plně poznány, ale v několika studiích bylo ukázáno, že MSC exprimují množství receptorů a adhezních molekul, díky kterým mohou putovat k poškozené tkáni. Schopnost migrace je závislá na několika faktorech, mezi které patří mimo jiné způsob podání, stáří, počet pasáží a zdroj MSC. Schopnost migrace může být také ovlivněná a zvýšená kultivací s různými cytokiny, jako je například IL-1 β nebo IL-6 (Sohni and Verfaillie, 2013).

4.3.1.3. Imunomodulační vlastnosti MSC

Důležitou vlastností MSC je jejich schopnost ovlivnit odpověď imunitního systému. Konstitutivně exprimují transformující růstový faktor- β (TGF- β , transforming growth factor- β), který umožňuje polarizaci imunitní odpovědi (Araújo et al., 2018). MSC v zánětlivém prostředí produkují řadu dalších imunomodulačních molekul. Po stimulaci interferonem- γ (IFN- γ , interferon- γ) *in vitro* dochází u MSC k aktivaci indoleamin 2,3-dioxygenázy (IDO, indoleamin 2,3-dioxygenase), která katalyzuje metabolismus tryptofanu směrem ke kynuerinu. Expozice IFN- γ vede dále ke zvýšení produkce IL-6, který může mít protizánětlivé účinky, k expresi PD-L1 (programmed death ligand-1), cévní adhezivní molekuly (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) galektinu-1 a mnoha dalších molekul (Gao et al., 2016; Huaman et al., 2019).

Další molekulou schopnou navodit u MSC zvýšení produkce IL-6, ale také například růstového faktoru pro hepatocyty (HGF, hepatocyte growth factor) nebo růstového faktoru pro fibroblasty (FGF, fibroblast growth factor) je IL-1 β (Broekman et al., 2016).

Imunomodulační vlastnosti MSC mohou být také regulovány pomocí faktoru nekrotizujícího nádory- α (TNF- α , tumor necrosis factor- α). MSC jsou zároveň schopné snižovat u makrofágů produkci TNF- α . Dalšími imunomodulačními molekulami, které jsou produkovány MSC po stimulaci, mohou být například cyklooxygenáza-2 (Cox-2, cyklooxygenase-2), prostaglandin E2 (PGE2) a mnohé další (Saldaña et al., 2019).

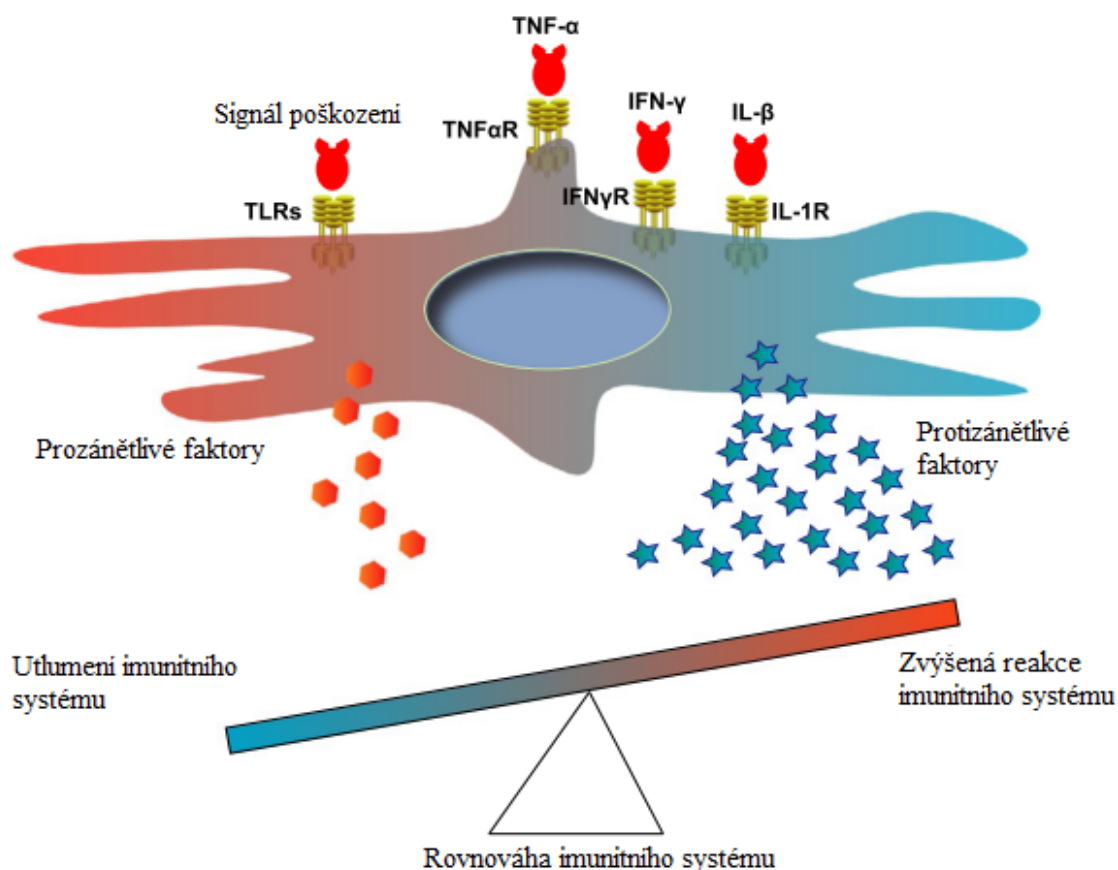
Bylo ukázáno, že MSC mohou inhibovat polarizaci makrofágů směrem k M1 populaci, která má silně prozánětlivé působení, a naopak mohou podpořit diferenciaci směrem k protizánětlivé M2 populaci (François et al., 2012; Li et al., 2019). Dále mohou působit také na apoptózu neutrofilů a snižovat u nich expresi antiapoptických molekul Bcl-xL a Mcl-1 (Su et al., 2019). U dendritických buněk (DC, dendritic cell) navozují expresi IL-10 a naopak potlačují sekreci IL-12. To může mít za následek snížení aktivace buněk přirozených zabijců (NK, natural killers). *In vivo* mohou potlačit migraci DC do lymfatických uzlin a tím regulovat odpověď T lymfocytů (Chiesa et al., 2011; Inzur and Fir, 2015).

V dalších studiích bylo ukázáno, že MSC mohou *in vitro* ovlivnit proliferaci T lymfocytů pomocí produkce chemokinu CCL2. Tato regulace může probíhat nejen na úrovni buněčného kontaktu, ale také díky produkci solubilních faktorů. Proliferace buněk imunitního systému může být snížena expresí oxidu dusnatého (NO) nebo PGE2. MSC dále inhibují proliferaci a diferenciaci T buněčných populací Th1 a Th17 a v jejich přítomnosti zvyšují produkci IL-10, TGF- β a PGE2. MSC tak podporují aktivaci T regulačních buněk (Gao et al., 2016; Luz-Crawford et al., 2013, Zhou et al., 2013). Buněčný cyklus T buněk může být také zastaven působením MSC v G1/G0 fázi (Glennie et al., 2005).

Další působení MSC může být směřováno také na B lymfocyty. I zde může být dělení zastaveno v G1/G0 fázi. MSC pomocí sekrece IL-1RA inhibují maturaci B buněk a jsou schopné regulovat produkci protilátek. Aktivita B lymfocytů může být dále inhibována přímým kontaktem, a to pomocí PD-1/PD-L1 interakce. MSC podporují produkci IL-10 regulačními B lymfocyty, což má za následek regulaci B buněčné odpovědi. Zároveň snižují expresi IL-4 a tím i stimulaci B lymfocytů (Corcione et al., 2006; Jiang and Xu, 2019; Lu et al., 2019).

MSC mohou mít za určitých podmínek také prozánětlivý efekt (**Obrázek 3**). Lidské MSC exprimují TLR-1 (Toll like receptor 1), 2, 3, 4, 5 a 6. Hladiny exprese TLR-3 a TLR4 jsou srovnatelné s hematopoetickými buňkami. Kultivace MSC s lipopolysacharidem (LPS) nebo poly I:C (polyinosinic–polycytidylic acid) vede k produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6, IL-8 a chemokinu CCL-5. Stimulace TLR-3 dále spouští aktivaci NF- κ B dráhy. Stimulace TLR také zvyšuje *in vitro* schopnost migrace MSC. (Giudicessi et al., 2008; Romieu-Mourez

et al., 2009). Zatímco aktivace TLR-4 vede spíše k produkci prozánětlivých faktorů, TLR-3 může navodit naopak protizánětlivé působení MSC. Po stimulaci TLR-3 také dochází ke snížení eliminace MSC pomocí IL-2 aktivovaných NK buněk (Giuliani et al., 2014; Waterman et al., 2010).



Obrázek 3. MSC mohou díky svým receptorům reagovat na podmínky prostředí a podpořit, nebo naopak utlumit imunitní odpověď (převzato a upraveno z Jiang and Xu, 2019).

4.4. Využití MSC pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice

Protektivní efekt MSC na buňky sítnice byl popsán v několika studiích *in vitro* i *in vivo*. Pro využití buněčné terapie byly studovány možnosti migrace do místa poškození, diferenciace v buněčné typy, které byly poškozeny, parakrinní působení MSC a v neposlední řadě také regulace imunitní odpovědi a zánětu.

4.4.1. Migrace a přežívání MSC v místě poškození

Vilela et al. (2018) studovali přežívání intravitreálně transplantovaných lidských MSC izolovaných z kostní dřeně a modifikovaných pomocí transdukce exprese luciferázy-2 v sítnici králíka. Luminiscence byla pozorovatelná až do 30. dne od aplikace a vnesené MSC byly pozorovány pouze v oblasti sklivce. Podobných výsledků bylo dosaženo i v další studii, kdy lidské MSC vneseny intravitreálně do oka králíka přežívaly ve sklivci dva týdny od transplantace. Bylo také ukázáno, že aplikované buňky dále extraokulárně nemigrovaly (Labrador Velandia et al., 2018).

Přežívání transplantovaných MSC v místě poškození bylo také testováno v práci, kdy byly buňky aplikovány potkanům s indukovaným diabetem a s ním spojenou DR. Potkaní MSC označené pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, green fluorescence protein) byly přítomny v oku 3 týdny po intravitreální aplikaci u jedinců s DR. Naopak u zdravých jedinců zde bylo pozorováno pouze malé množství GFP pozitivních buněk (Čerman et al., 2016). Rajashekhar et al. (2014) získali podobné výsledky studováním lidských MSC z tukové tkáně transplantovaných intravitreálně myším s indukovaným diabetem. Také zde byl počet GFP značených MSC po 21 dnech vyšší u jedinců s vyvolaným onemocněním oproti zdravým kontrolám, které obdržely stejné množství buněk. To naznačuje, že MSC přežívají především v oblasti poškození, zatímco ve zdravé sítnici jejich počet klesá s časem podstatně rychleji. Inkorporace transplantovaných buněk do sítnice po intravitreálním podání však může být závislá nejen na místě poškození, ale také na délce působení. U laserem poškozené sítnice potkanů byla po dvou týdnech většina intravitreálně vnesených buněk především v oblasti sklivce, po 4 týdnech pak byla zaznamenána pomalá migrace do neurální části sítnice a po 8 týdnech byly téměř všechny buňky plně inkorporovány do sítnice (Castanheira et al., 2008).

Kromě intravitreálního podání mohou být MSC aplikovány také systémově. Po intravenózní aplikaci myších MSC značených pomocí GFP nebyly v sítnici u myši poškozené laserem nalezeny žádné vnesené buňky. Přesto však bylo zaznamenáno snížení apoptózy a zlepšení morfologické struktury oproti neléčeným jedincům (Jiang et al., 2014). Tyto výsledky ukazují, že působení MSC nemusí být závislé pouze na buněčném kontaktu, ale může být využito i jejich parakrinní působení.

4.4.2. Diferenciace MSC na buňky exprimující znaky buněk sítnice

V mnoha studiích bylo ukázáno, že MSC mají schopnost diferencovat se v rozdílné buněčné typy. Během degenerativních onemocnění sítnice dochází u pacientů většinou k poškození a následné ztrátě buněk, především RPE vrstvy a fotoreceptorů. Jejich nahrazení pomocí využití diferencovaných MSC proto bylo předmětem několika studií. Myší MSC kultivované *in vitro* v prostředí simulující zánětlivé podmínky v sítnici exprimovaly znaky typické pro fotoreceptory: rodopsin, S antigen a rekovertin (Hermankova et al., 2017). Dále došlo u takto stimulovaných MSC k navýšení exprese *Rlbp a Rpe65* – genů typických pro RPE buňky. Exprese těchto znaků byla zvýšená v přítomnosti IFN- γ . Podobně lidské MSC izolované z tukové tkáně kultivované v přítomnosti efektorových imunitních buněk a sítnicových antigenů vykazovaly už po 24 h znaky pro retinální progenitorové buňky. Po 72 h pak docházelo u těchto buněk k postupné diferenciaci na další buněčné typy sítnice, jako jsou například fotoreceptory, Mülerovy buňky a RPE buňky (Moviciglia et al., 2012).

Další možností *in vitro* diferenciaci MSC v buňky exprimující znaky pro fotoreceptory je kultivace v přítomnosti taurinu, který se za fyziologických podmínek hojně vyskytuje v sítnici a kromě funkce neuromodulátoru a neurotransmiteru má také protektivní účinky (Jin et al., 2009). Podobně tomu bylo i v případě myších MSC, které byly kultivovány s taurinem, aktivinem A a epidermálním růstovým faktorem. Přibližně 30% populace takto indukovaných buněk vykazovalo znaky typické nejen pro fotoreceptory, ale také pro amakrinní buňky (Kicic et al., 2003). Navýšení diferenciačního potenciálu při *in vitro* indukci taurinem bylo dosaženo kultivací MSC z Whartonova rosolu, kterým byla zvýšená exprese erythropoietinu pomocí transdukce (Ding et al., 2019). MSC izolované z kostní dřeně myšího kmene NOD (často využívaného pro výzkum diabetu 1. typu a s ním spojené DR), po indukci pomocí proteinu pro růst mozkových buněk (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), nervovým růstovým faktorem (NGF, nerve growth factor) a FGF vykazovaly po 14 dnech znaky typické pro sítnicové buňky, ale diferenciační potenciál byl nižší než u MSC izolovaných z kontrolních myší. To naznačuje snížení terapeutického potenciálu při autologní transplantaci MSC z kostní dřeně pacientům s DR (Zanto et al., 2013).

Diferenciace MSC v buňky sítnice byla pozorována také *in vivo*. Potkanům byly 24 h po indukci poškození sítnice pomocí laseru intravitálně aplikovány MSC z kostní dřeně značené pomocí DAPI. Osmý den po transplantaci byly tyto buňky nalezeny inkorporované v sítnici a vykazovaly znaky pro fotoreceptory, bipolární buňky a také Mülerovy buňky. U DAPI

pozitivních buněk však nebyly nalezeny žádné znaky typické pro RPE vrstvu buněk (Castanheira et al., 2008). Naopak u myši s indukovaným diabetem pomocí aplikace streptozotocinu, kterým byly podány intravitreálně GFP pozitivní MSC, nevykazovaly dárcovské buňky 12 týdnů po transplantaci znaky pro sítnicové gliové buňky, astrocyty ani pericyty (Ezquer et al., 2016). Pro hlubší poznání *in vivo* diferenciaci MSC v buňky sítnice a jejich následný potenciál pro funkční nahrazení poškozených buněk sítnice je však nutné provést další výzkum.

4.4.3. Regulace imunitní odpovědi v sítnici pomocí MSC

Důležitou úlohu v rozvoji degenerativních onemocnění sítnice hraje lokální zánětlivá reakce. V poškozené sítnici dochází k produkci celé řady cytokinů a infiltraci buňkami imunitního systému. MSC *in vitro* regulují proliferaci T lymfocytů, snižují expresi IFN- γ dendritickými buňkami, a naopak zvyšují sekreci imunomodulačních faktorů TGF- β a PGE2. Zvýšené produkce těchto dvou molekul byly následně prokázány *in vivo* v sítnici potkanů, kterým bylo navozeno poškození gangliových buněk a poté intravitreálně transplantovány MSC (Millán-Rivero et al., 2018).

U modelu oční hypertenze, která byla u potkanů vyvolána lokálním podáním hyaluronové kyseliny, došlo po 4 týdnech ke zvýšení hladiny exprese IFN- γ a TNF- α . Intravitreální transplantace alogenních MSC však tento efekt potlačila. Zároveň byla pozorována také vyšší hladina TGF- β oproti kontrolní skupině a neléčeným jedincům (Emre et al., 2015).

Explantáty sítnic myši, které byly *in vitro* kultivovány v zánětlivém prostředí navozeném IL-1 β , TNF- α a IFN- γ exprimovaly po 48 h zvýšené hladiny genů pro IL-1 α , IL-6 a inducibilní syntázu oxidu dusnatého (iNOS, inducible nitric oxide synthase). V přítomnosti MSC byl tento nárůst znatelně snížen. Podobně tomu bylo i při *in vivo* aplikaci cytokinů lokálně do sklivce. Po intravitreálním podání IL-1 β , TNF- α a IFN- γ došlo v sítnici k nárůstu populace F4/80⁺, CD80⁺, CD11b⁺, CD3⁺ a CD54⁺ buněk. Zároveň byly zvýšené hladiny exprese genů pro IL-1 α , IL-6, iNOS, TNF- α a VEGF. Při aplikaci cytokinů společně s MSC však byla infiltrace buněk imunitního systému a produkce prozánětlivých faktorů v sítnici významně snížena (Hermankova et al., 2019).

4.4.4. Parakrinní působení MSC na buňky sítnice

MSC jsou schopné *in vitro* a *in vivo* produkovat řadu neurotrofických faktorů, které mohou následně přispět k regeneraci buněk a jejich ochraně před dalším poškozením. Intravitreální

podání GFP pozitivních MSC myším s navozenou DR výrazně zvýšilo v sítnici po dobu až 12 týdnů expresi NGF a FGF. Zároveň bylo pozorováno, že u myší s DR nedošlo k odumření sítnicových gangliových buněk, ale transplantované GFP pozitivní MSC neexprimovaly β -3 tubulin (znak typický pro sítnicové gangliové buňky). Terapie měla protektivní efekt, ale nedošlo k diferenciaci v buněčné typy, které byly onemocněním poškozeny. Naopak u jedinců, kterým nebyly aplikovány MSC, byl sledován výrazný pokles gangliových buněk (Ezquer et al., 2016). Navýšení neurotrofických faktorů NGF a BDNF po intravitreálním podání MSC bylo pozorováno také v sítnici potkanů s navozeným poškozením gangliových buněk (Millán-Rivero et al., 2018).

Protektivní účinky BDNF na buňky sítnice byly testovány aplikací MSC, kterým byla indukována zvýšená samovolná produkce tohoto růstového faktoru. Po podání takto modifikovaných buněk do potkaního oka poškozeného laserem bylo zaznamenáno zlepšení optických nervových funkcí oproti jedincům, kteří obdrželi neovlivněné MSC. MSC by tak mohly mimo jiné sloužit jako nosič pro distribuci neurotrofických faktorů do sítnice (Harper et al., 2011). Lejkowska et al. (2019) dosáhli podobných výsledků využitím myších MSC modifikovaných pomocí lentiviru k expresi BDNF. Takto modifikované buňky přežily po intravitreální aplikaci myším s poškozenou sítnicí až 3 měsíce. Dále bylo pozorováno, že u těchto myší došlo také ke snížení exprese proapoptických genů a naopak navýšení exprese genů antiapoptických.

Vliv MSC na snížení apoptózy buněk sítnice byl pozorován i v další práci, kdy u MSC izolovaných z tukové tkáně potkanů byla indukována zvýšená exprese hemoxigenázy 1 (HO-1), enzymu s antioxidantními účinky. Gangliové buňky sítnice byly následně kultivovány *in vitro* s peroxidem vodíku, který navodil u těchto buněk zvýšenou hladinu ROS a zvýšení exprese proapoptických faktorů, jako je Bax a kaspáza 3. V přítomnosti MSC exprimujících HO-1 bylo zaznamenáno snížení exprese těchto proapoptických genů a naopak zvýšení exprese anti-apoptického genu *Bcl2*. Podobných výsledků bylo dosaženo také *in vivo*, kdy bylo srovnáno použití neovlivněných MSC a MSC se zvýšenou expresí HO-1 u potkanů s navozenou degenerací sítnice. Snížení exprese proapoptických genů a zvýšení exprese antiapoptických genů bylo pozorováno oproti neléčeným jedincům u obou skupin, kterým byly aplikovány MSC, ale efekt byl výraznější při použití modifikovaných buněk (Li et al., 2017).

Pro terapeutické účely je studován také parakrinní efekt MSC s využitím kondiciovaného média. Kondiciované médium z kultivace lidských MSC izolovaných z tukové tkáně snižovalo *in vitro* degeneraci lidských epiteliálních buněk sítnice poškozených vystavením vysoké

hladině glukosy a TNF- α . MSC byly během kultivace stimulovány cytokiny TNF- α a IFN- γ , které v buňkách navodily imunomodulační vlastnosti a zvýšenou expresi některých cytokinů, jako je například CCL2, IL-6, IL-8 a další. Následné intravitreální podání takto kultivovaných buněk Ins2^{Akita} myším (modelový kmen pro studium DR) snížilo po 3 týdnech od transplantace propustnost retinální bariéry oproti neléčeným jedincům. Podobně tomu bylo i při použití kondicionovaného média, což naznačuje, že velkou úlohu při použití této terapie hraje parakrinní působení MSC (Elshaer et al., 2018).

Další možností při terapii onemocnění sítnice je systémové podání MSC. U myši s poškozenou sítnicí laserem nebyly po intravenózním podání v oblasti oka nalezeny MSC označené GFP. Přesto došlo k poklesu matrix metaloproteinazy 2 (která je spojená s patologickými stavy zahrnujícími například remodelaci tkáně) oproti neléčeným jedincům, kde byla produkce tohoto enzymu silně zvýšená (Jiang et al., 2014).

4.4.5. Využití MSC pro léčbu sítnice na modelu NaIO₃

Poškození RPE vrstvy sítnice, degenerace fotoreceptorů a následná migrace makrofágů po systémovém podání NaIO₃ představuje vhodný model pro sledování terapeutického potenciálu transplantovaných MSC. Subretinální podání lidských MSC z tukové tkáně 24h po indukci poškození sítnice pomocí NaIO₃ zlepšilo u myšičího modelu stav RPE vrstvy buněk, fotoreceptorů a buněk vnější jádrové vrstvy (Barzelay et al., 2018).

Přežívání MSC v oku poškozeném systémovým podáním NaIO₃ bylo pozorováno také u potkanů. MSC, do kterých byl vnesen gen pro GFP, byly aplikovány subretinálně v množství přibližně 200 000 buněk 4. den od navození poškození. Pátý týden od transplantace byly GFP pozitivní buňky nalezeny především v subretinální oblasti, naopak nedocházelo k jejich integraci do neuroretiny. U těchto buněk byla navíc pomocí imunohistochemické analýzy zaznamenána exprese rodopsinu a gliového fibrilárního kyselého proteinu (Gong et al., 2008).

Machalińska et al. (2013) se zaměřili u modelu využívajícího NaIO₃ k poškození sítnice na studium vlivu, migrace a přežívání transplantovaných MSC, kterým byla pomocí lentivirového vektoru transdukována exprese neutrophinu-4. Neutrophin-4 patří do rodiny růstových faktorů, které hrají důležitou úlohu v přežívání nervových buněk a zároveň se mohou také podílet na migraci a proliferaci. Takto geneticky modifikované MSC byly po intravitreální aplikaci myším nalezeny integrované v zadním segmentu oka i 3 měsíce po transplantaci.

GFP pozitivní buňky z kostní dřeně podané intravitreálně myším, kterým bylo navozeno poškození sítnice pomocí NaIO₃, byly nalezeny 7. den od transplantace v oblasti sítnice, jejich počet se však po dalším týdnu snížil (Atmaca-Sonmez et al., 2006). Naopak po aplikaci NaIO₃ nebyly intraperitoneálně podané MSC z tukové tkáně nalezeny v oblasti sítnice, přesto však bylo u léčených jedinců zaznamenáno zlepšení vrstvy fotoreceptorů oproti neléčeným myším. To ukazuje, že i v tomto případě nemusí být efekt terapie závislý pouze na buněčném kontaktu (Heo et al., 2018).

Migrace buněk přímo z kostní dřeně, při navození degenerace sítnice použitím NaIO₃, byla studována také v dalších modelech. Myším s GFP pozitivními buňkami kostní dřeně byly 4 hodiny po aplikaci NaIO₃ podávány hematopoetické růstové faktory – faktor stimulující granulocyty a Flt3 ligand. Zatímco samotné podání retinotoxinu nezpůsobilo u sledovaných myší navýšení buněk kostní dřeně v periferní krvi, po podání zmíněných růstových faktorů došlo k jejich vyplavení a migraci do místa poškození (Li et al., 2007).

V *in vitro* modelu byl testován vliv MSC na lidské ARPE-19 buňky kultivované společně s NaIO₃. V nepřítomnosti MSC docházelo u RPE buněk po působení NaIO₃ ke zvýšení exprese IL-1 β , proapoptického proteinů Bax a naopak snížení antiapoptického Bcl-2. Tento efekt byl snížen v přítomnosti MSC. Kromě protektivních účinků MSC také indukovaly zvýšení proliferativních schopností ARPE-19 buněk kultivovaných s NaIO₃. Toto navýšení bylo způsobeno sekrecí FGF (Mao et al., 2018).

4.5. Příklady klinických studií

Klinické studie využití MSC pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice jsou v současné době především v 1. a 2. fázi, kdy je testována bezpečnost použití této terapie. MSC používané v těchto studiích jsou izolovány z kostní dřeně, tukové tkáně nebo Whartonova rosolu a následně jsou aplikovány lokálně pacientům s degenerativním onemocněním sítnice, jako je například RP, AMD, DR a glaukom (clinicaltrials.gov).

V ukončených studiích využívajících lokální podání autologních MSC izolovaných z kostní dřeně nebyl u pacientů zaznamenán výskyt lokální zánětlivé reakce po aplikaci buněk, ani nedocházelo k hyperproliferaci. Přesto však je potřeba dalších studií pro ověření účinků této terapie (Park et al., 2014; Siqueira et al., 2015; Weiss and Levy 2018).

5. Metody

5.1. Zvířata

Do pokusů byly použity samice myši imbredního kmene BALB/c ve věku 15-18 týdnů. Myši pocházely z chovu Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v. v. i. (ÚMG AV ČR). Všechny experimenty byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny, AV ČR.

5.2. Media a roztoky

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), s obsahem 5% nebo 10% tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra (fetal calf serum, FCS, Gibco, Saranac, NY), antibiotika streptomycin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) a penicilin (100 U/ml, Sigma-Aldrich) a HEPES pufru (10mM, Sigma-Aldrich), dále označováno jako DMEM, bylo použito k izolaci a kultivaci MSC.

Explantáty sítnic byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), s obsahem 10% inaktivovaného FCS (Gibco, NY), streptomycin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) a penicilin (100 U/ml, Sigma-Aldrich) a HEPES pufru (10 mM, Sigma-Aldrich).

Pro FACS analýzu a pro přípravu roztoku NaIO₃ byl použit fosfátový pufr (PBS, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄ a 1,44 Na₂PO₄ v 1 litru destilované vody, pH = 7,2, připravený v servisní laboratoři ÚMG AV ČR).

Pro přípravu jednobuněčné suspenze buněk explantátů sítnic byl použit 1% roztok kolagenázy I (Sigma-Aldrich) a Hankův pufrový roztok s hořečnatými a vápenatými ionty (HBSS^{Ca⁺, Mg⁺}, Hank's balanced salt solution, ÚMG AV ČR).

Roztok NaIO₃ (sodium iodate, Sigma-Aldrich) pro *in vivo* navození degenerace sítnice byl připravován v koncentraci 2,5 mg/ml rozpuštěním v PBS.

Anestetika Calypsol (xylasini hydrochloridum, 20 mg/ml, Bioveta, a.s, Ivanovice na Hané, ČR) a Rometar (ketamini hydrochloridum 50 mg/ml, Bioveta, a.s, Ivanovice na Hané, ČR) byly připraveny s H₂O pro tkáňové (ÚMG AV, ČR) v poměru 1:10 (Calypsol) a 1:5 (Rometar).

5.3. Technické vybavení

- Průtokový cytometr LSR II (BD, Franklin Lakes, NJ)
- Magnetický separátor AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)

- Optický mikroskop Olympus CKX31 (Olympus, Tokio, Japan)
- Optický mikroskop Olympus CKX41 (Olympus, Tokio, Japan)
- Operační mikroskop Leica (Wild Heerbrugg – Leitz, Heerbrugg, CH)
- ELISA reader Sunrise (TECAN, Männensdorf, CH)
- Spektrofotometr Nanodrop ND 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE)
- Cyklier StepOne Plus RT-PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)
- Cyklier PTV-200 (MJ research, Warertoen, MA)
- Centrifuga Universal 320R (Hettich, DE)
- Centrifuga Universal 320 (Hettich, DE)
- Minicentrifuga Cleaver (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK)
- Vortex IKA MS1 minishaker (IKA Works, Staufen im Breisgau, DE)
- Třepačka IKA MS3 digital shaker (IKA Works, Wilmington, NC)
- CO₂ inkubátor (Sanyo Electric, Osaka, Japan)
- Laminární box Clean Air (Telstar, JA Woerden, NL)

5.4. Použitý software

- StepOne Software 2.2.2 – vyhodnocení dat z RT-PCR
- Microsoft Excel – vyhodnocení dat z RT PCR
- GraphPad 8.0 – statistické zpracování výsledků
- FACSDiva Software (BD) – ovládání průtokového cytometru
- FlowJo 9 (LCC, Ashland, OR) – vyhodnocené dat z průtokového cytometru
- Kim 32 (Schoeller Instruments, s.r.o., Praha, ČR) – zpracování spektrofotometrických dat

5.5. Izolace, kultivace a separace MSC

MSC byly izolovány z kostní dřeně myši BALB/c výplachem z holenních a stehenních kostí pomocí 5% DMEM. Kostní dřev byla dále zhomogenizována ve skleněném homogenizátoru, přenesena do zkumavek a 8 minut centrifugována při 170 g. Peleta buněk byla následně resuspendována v 5 – 6 ml DMEM a přenesena do 25 cm² kultivační lahve (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), ve které byly buňky dále kultivovány v CO₂ inkubátoru při 37 °C. K odstranění neadherentních buněk byly buňky kostní dřeně po 48 h kultivace opláchnuty médiem DMEM nahřátým na 37 °C. Následně byly adherentní buňky dále

kultivovány a pasážovány v 75 cm² kultivačních lahvích (Thermo Fisher Scientific) po dobu 16 dnů.

Po uplynutí této doby bylo z kultivačních lahví odstraněno medium, přidán 1 ml 0,5 % trypsinu (Sigma) a po 5 min. přidáno DMEM medium. Neuvolněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí sterilní škrabky. Buňky byly přeneseny do zkumavek a centrifugovány 8 minut při 170g. Vzniklá peleta byla naředěna DMEM mediem a koncentrace buněk byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky. Pro separaci MSC bylo na každých 10⁷ buněk přidáno 70 µl autoMACS pufru (magnetic activated cell sorting, magneticky aktivované třídění buněk; Miltenyi Biotec), 15 µl CD11b MicroBeads (Miltenyi Biotec) a 15 µl CD45 MicroBeads (Miltenyi Biotec) a vzorek byl ponechán 15 min. při 4 °C. Po uplynutí této doby byly buňky opláchnuty nadbytkem autoMACS pufru a centrifugovány 8 min při 170g. Vzniklá peleta byla resuspendována v 500 µl autoMACS pufru a buňky byly přefiltrovány přes silonový filtr do nové zkumavky. Následně byly buňky separovány metodou MACS. K negativní frakci bylo přidáno DMEM medium a MSC byly dále používány do pokusů.

Pro detekci relativní genové exprese byly MSC kultivovány ve 24-jamkové destičce (100 000 MSC/jamka; TPP Trasadingen, CH) v 1 ml DMEM nebo v 1 ml DMEM a v přítomnosti prozánětlivých cytokinů IFN- γ , TNF- α a IL-1 β (PeproTech, Rocky Hill, NJ) v koncentraci 10 ng/ml. Po 48 h kultivace bylo medium odebráno a buňky byly přeneseny do 500 µl TRI reagent (MRC, Molecular Research Center, Cincinnati, ME) společně s 1,5 µl Polyacetyl carrier (MRC) a zamrazeny v -80 °C.

5.6. Model poškození sítnice *in vivo*

Myši byly intraperitoneálně (i.p.) podáno 400 µl roztoku NaIO₃ v PBS v koncentraci 2,5 mg/ml. Množství aplikovaného NaIO₃ odpovídalo 50 mg/kg. Kontrolní myši obdržely stejné množství PBS bez NaIO₃.

5.7. Lokální aplikace MSC

Myši byly uspány intramuskulárně pomocí injekční stříkačky Omniflix U-100 insulin (B. Braun Melsungen AG, DE) 340 µl směsi Calypsolu a Rometaru v poměru 1:1. Po uspání byly oči rozkapány kapkami UNITROPIC 1% (Unimed Pharma s.r.o., Bratislava, SK) a NEOSYNEPHRIN 10% (Urspharm s.r.o., Praha, ČR) a pod operačním mikroskopem bylo pomocí mikrostríkačky s objemem 5 µl a 33G jehly (Hamilton, Reno, NV) do pravého oka podáno intravitreálně 2 µl MSC (20 000 buněk v bezsérovém RPMI 1640 mediu), nebo 2 µl

bezsérového RPMI 1640 media. Následně bylo po zákroku oko ošetřeno očním gelem VIDISIC (Dr.Gerhard Mann Pharma, Berlin, DE).

5.8. Odběr explantátů sítnic

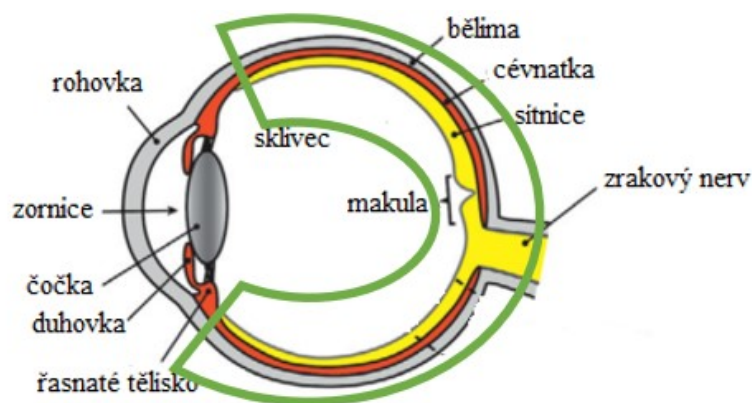
Pod operačním mikroskopem byly z oční koule odstraněny rohovka, čočka a sklivec. Neurální část sítnice byla následně opatrně vyjmuta a přenesena do 48-jamkové destičky (TPP) pro další kultivaci v CO₂ inkubátoru při 37 °C, případně přenesena do 500 µl TRI reagent společně s 1,5 µl Polyacyl carrier a zamražena v -80 °C, nebo byla zhomogenizována a využita pro analýzu pomocí FACS (fluorescence activated cell sorting, fluorescencí aktivované třídění buněk).

5.9. Model poškození sítnice *in vitro*

Pod operačním mikroskopem byly z oční koule odstraněny rohovka, čočka a sklivec. Zadní segment společně s neporušenou vrstvou RPE buněk a neurální sítnicí (**Obrázek 4.**) byl následně přenesen do 48-jamkové destičky obsahující 10% RPMI 1640 medium nebo medium obsahující NaIO₃ v požadované koncentraci podle pokusu. Zadní segment oka byl následně kultivován po dobu 24 h, 48 h nebo 72 h.

5.10. Kultivace sítnice a zadního segmentu oka s MSC

Do 48-jamkové destičky bylo nanášeno 20 000 MSC na jamku v 1 ml DMEM. Po 24 h bylo medium odebráno a přidáno 10% RPMI 1640 medium, případně RPMI 1640 medium s 0,5 mg/ml NaIO₃. Do jamek byly následně přidány zadní segmenty společně s neurální částí sítnice, nebo samotná neurální sítnice. Destička byla dále kultivována 48 h v CO₂ inkubátoru při 37 °C. Poté byly explantáty sítnic přeneseny do 500 µl TRI reagent s 1,5 µl Polyacryl carrier, a zamrazeny v -80 °C.



Obrázek 4. **Odběr zadního segmentu.** Zeleně je vyznačena oblast zadního segmentu odebírána pro *in vitro* kultivaci (převzato a upraveno z Caceres and Rodriguez-Boulan, 2019).

5.11. Kultivace zadního segmentu oka v přítomnosti NaIO_3 a se supernatantem z MSC nebo vybranými cytokiny

Pro testování parakrinního působení MSC byly zadní segmenty oka kultivovány s NaIO_3 v přítomnosti supernatantu z MSC nebo vybraných cytokinů, které jsou MSC produkovány. MSC (20 000 MSC/jamka) byly kultivovány ve 48-jamkové destičce v 1 ml DMEM nebo v 1 ml DMEM společně s $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ (koncentrace 10 ng/ml). Po 24 h kultivace v CO_2 inkubátoru při 37 °C bylo medium odstraněno a buňky důkladně opláchnuty a do každé jamky bylo přidáno 1 ml RPMI 1640 media. MSC byly následně kultivovány v CO_2 inkubátoru při 37 °C 48 h. Po uplynutí této doby byl odebrán supernatant a dále používán v pokusech.

Zadní segmenty oka byly kultivovány ve 48-jamkové destičce v přítomnosti 1 ml supernatantu z MSC a NaIO_3 v konečné koncentraci 0,5 mg/ml. Pro studium působení vybraných cytokinů byly zadní segmenty kultivovány ve 48-jamkové destičce v 1 ml RPMI 1640 media a v přítomnosti 5 ng/ml $\text{TGF-}\beta$ nebo 10 ng/ml HGF (PeproTech). Po 48 h kultivace v CO_2 inkubátoru při 37 °C byly zadní segmenty přeneseny do 500 μl TRI reagent s 1,5 μl Polyacryl carrier, a zamrazeny v -80 °C.

5.12. Izolace mRNA

Sítnice byly v 500 μl TRI reagent zhomogenizovány pomocí plastového homogenizátoru a k homogenitu bylo přidáno 100 μl chloroformu (Penta, Praha, ČR). Směs byla následně silně protřepána, aby došlo ke spojení složek. Po 10 min při laboratorní teplotě došlo k oddělení fází a vzorek byl centrifugován 15 min při 4 °C a 12 000g. Horní fáze byla přenesena do nové

zkumavky a bylo k ní přidáno 250 μ l izopropanolu (Penta). Obě složky byly opatrně promíchány a vzorek byl dále ponechán 10 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován 10 min při 4 °C a 12 000g. Ke vzniklé peletě bylo přidáno 500 μ l 75% ethanolu (Penta) a vzorky byly v mikrocentrifuze centrifugovány 5 min. Ethanol byl odsát a peleta nechána při laboratorní teplotě vysušit. Následně byla resuspendována v 10 μ l PCR vody (Top-Bio, Praha, ČR) a zamražena v -80°C

5.13. Reverzní transkripce

Pomocí spektrofotometru byla změřena koncentrace mRNA. Jeden μ g vzorku byl odebrán a naředěn do celkového objemu 8 μ l PCR vodou. Ke vzorku byly následně přidány 2 μ l směsi reakčního pufru Dnázy I (Ndase I reaction buffer, Promega, Madison, WI) a Dnázy I (1U/ μ l, Promega) v poměru 1:1. Vzorek byl v cycleru po dobu 30 min. zahříván na 37 °C. Pro inaktivaci Dnázy I byl přidán 1 μ l RQ1 Dnase Stop Solution (Promega) a vzorek byl ponechán v cycleru 10 min při 65 °C. Dále bylo přidáno do vzorku 5 μ l M-MLV Reaction Buffer (Promega), 5 μ l dNTP (z koncentrace 40 mM, 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. Přepis do formy cDNA následně proběhl v cycleru po dobu 60 min. a 37 °C.

5.14. PCR

cDNA byla analyzována pomocí metody RT-PCR. Relativní genová exprese byla stanovena vzhledem k referenčnímu genu glycerinaldehyd dehydrogenázy (GAPDH). K testovaným vzorkům bylo přidáno 50 μ l PCR vody. Do 96-jamkové destičky pro PCR (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, Life Technologies, Carlsbad, CA) bylo napipetováno 7 μ l mixu složeného z 1 μ l primeru (1:1 sense a antisense primer, Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR, viz **Tabulka 1**), 1 μ l PCR vody a 5 μ l SYBR green (Power SYBR Green PCR master MIX, Applied Biosystems, Warrington, UK). Následně byly přidány připravené vzorky v objemu 3 μ l. Analýza byla prováděna pomocí StepOne Plus RT-PCR systém (Applied Biosystems).

Nastavení PCR reakce bylo:

- aktivace Hot start polymerázy při 95 °C po dobu 3 min.

- 40 cyklů: denaturace cDNA po dobu 10 vteřin při 95 °C, hybridizace po dobu 20 vteřin při 65 °C, elongace po dobu 20 vteřin při 72 °C a detekce fluorescence po dobu 5 vteřin při 82 °C
- analýza křivek tání zvyšováním teploty o 0,5 °C každých 10 vteřin od 55 °C do 95 °C

Pro výpočet relativní exprese genů byl použit relativní model kvantifikace v porovnání s GAPDH.

Tabulka 1: Seznam použitých primerů (s – sense, a – antisence)

Primer	Sekvence
GAPDH s	AGAACATCATCCCTGCATCC
GAPDH a	ACATTGGGGGTAGGAACAC
IL-1 α s	TTGGTTAAATGACCTGCAACA
IL-1 α a	GAGCGCTCACGAACAGTTG
IL-1 β s	AGTTGACGGACCCCAAAG
IL-1 β a	AGCTGGATGCTCTCATCAGG
IL-6 s	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA
IL-6 a	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
Rodopsin s	TGCCCTCAGGGATGTACC
Rodopsin a	ACCTGGATCATGGCGTTG
Bax s	CTACAGGGTTTCATCCAG
Bax a	CCAGTTCATCTCCAATTCG
Bcl-2 s	GTGGATGACTGAGTACCT
Bcl-2 a	CCAGGAGAAATCAAACAGAG
p53 s	GTATTTACCCTCAAGATCC
p53 a	TGGGCATCCTTTAACTCTA
Cox-2 s	AGCCCACCCCAAACACAGT
Cox-2 a	AAATATGATCTGGATGTCAGCACATATT
iNOS s	CTTTGCCACGGACGAGAC
iNOS a	TCATTGTA CTCTGAGGGCTGAC
HGF s	CACCCCTTGGGAGTATTGTG
HGF a	GGGACATCAGTCTCATTCACAG
TGF- β s	TGGAGCAACATGTGGA ACTC

TGF- β a	CAGCAGCCGGTTACCAAG
GDNF s	GACATCCCATAACTTCATCTTAGAGTC
GDNF a	TCCAACCTGGGGGTCTACG
NGF s	TGGACTGCACGACCACAG
NGF a	AAATTAGGCTCCCTGGAGGT

5.15. Test metabolické aktivity pomocí WST-1

Pro stanovení *in vitro* působení rozdílných koncentrací NaIO₃ na buňky sítnice byl proveden test metabolické aktivity využívající schopnost živých buněk štěpit tetrazoliové soli pomocí mitochondriálních dehydrogenáz na formazan. Zadní segmenty oka společně s neurálními částmi sítnice byly kultivovány ve 48-jamkové destičce při teplotě 37 °C po dobu 24 h, 48 h a 72 h pouze v 1 ml RPMI 1640 mediu, nebo v mediu s NaIO₃ v koncentracích 0,1; 0,5; 1 nebo 2 mg/ml. Poté bylo z jamky odebráno 700 μ l media a do zbývajících objemu 300 μ l následně přidáno 30 μ l tetrazoliové soli-1 (water soluble tetrazolium-1, WST-1, Roche, Penzberg, Německo). Destička byla dále 2,5 h inkubována. Po vytvoření formazanu bylo z každé jamky přeneseno 100 μ l do 96-jamkové destičky (TPP) a pomocí ELISA readeru byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm.

5.16. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Produkce IL-6 a HGF byla měřena pomocí DuoSet ELISA testu (R&D Systems, Mineapolis, MN). Všechny reagentie byly použity v koncentracích doporučených výrobcem. MSC v koncentraci 100 000 buněk/ml byly kultivovány ve 24-jamkové destičce (TPP) v 1 ml DMEM nebo v 1 ml DMEM a v přítomnosti prozánětlivých cytokinů IFN- γ , TNF- α a IL-1 β v koncentraci 10 ng/ml. Po 48 h kultivace bylo odebráno 500 μ l supernatantu pro detekci cytokinů. Pro měření bylo do vysokoabsorbční 96-jamkové destičky (Costar, Cambridge, MA) naneseno 100 μ l primární protilátky a inkubováno přes noc při laboratorní teplotě. Následně byly destičky 3x promyty promývacím pufrém (0,05% Tween 20 v PBS) a blokovány pomocí blokovacího roztoku (1% BSA v PBS) při laboratorní teplotě po dobu 1 h. Po uplynutí této doby byly destičky 3x promyty promývacím roztokem. Do destiček bylo naneseno 100 μ l vzorků a standartů a inkubováno 2 h při laboratorní teplotě. Následně byly destičky 3x promyty a do jamek bylo přidáno 100 μ l detekční protilátky v reakčním pufru a inkubováno 2 h. Destičky byly 3x promyty a bylo přidáno 100 μ l roztoku Streptavidin peroxidázy (R&D Systems)

inkubovány po dobu 20 min při pokojové teplotě. Destičky byly po uplynutí této doby 3x promyty a bylo přidáno 100 μ l substrátu (H_2O_2 : tetramethylbenzidin, 1 : 1, R&D Systems) a ponecháno 20 min. Následně bylo pro zastavení reakce přidáno 50 μ l 2M roztoku kyseliny sírové (Penta). Intenzita zabarvení byla posléze detekována pomocí spektrofotometru (referenční filtr 550 nm, měřící filtr 450 nm). Pomocí programu KIM 32 byla naměřená optická denzita přepočítána, výsledná koncentrace byla stanovena v pg/ml podle ředící řady standardu daného cytokinu.

5.17. Příprava suspenze buněk sítnic pro průtokovou cytometrii

Zadní segmenty společně s neurální částí sítnice, případně samotná neurální část sítnice, byly přeneseny do 180 μ l HBSS^{Ca⁺, Mg⁺}, pomocí plastového homogenizátoru zhomogenizovány, a následně bylo přidáno 20 μ l kolagenázy I. Suspenze byla nechána 45 min při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby byl k suspenzi přidán nadbytek RPMI 1640 media a přes filtr byla suspenze buněk přenesena do nových zkumavek a centrifugována při 170g 8 min. Poté byla peleta buněk resuspendována ve 100 μ l PBS a použita pro průtokovou cytometrii.

5.18. Průtoková cytometrie

Pro průtokovou cytometrii byly použity monoklonální protilátky (mAb, monoclonal antibody), které jsou konjugované s fluorochromy fluorescein isothiokyanát (FITC, fluorescein isothiocyanate), alofykocyanin (APC, allophycocyanine) nebo fykoerytrin (PE, phycoerythrin).

Pro značení povrchu byla suspenze buněk ze sítnic nebo MSC rozpipetována do mikrokultivační destičky s kulatým dnem (Nunc) a 3 min centrifugovány při 140 g. Následně byly buňky promyty pomocí PBS, pelety byly rozvolněny a k buňkám bylo přidáno 10 μ l protilátky ředěné v PBS dle **Tabulky 2**. Destička byla inkubována ve tmě 30 min při 4 °C. Vzorky byly promyty a resuspendovány v 200 μ l PBS. Pro značení mrtvých buněk bylo přidáno 20 μ l fluorescenční barvičky Hoechst 33258 v koncentraci 1 μ g/ml.

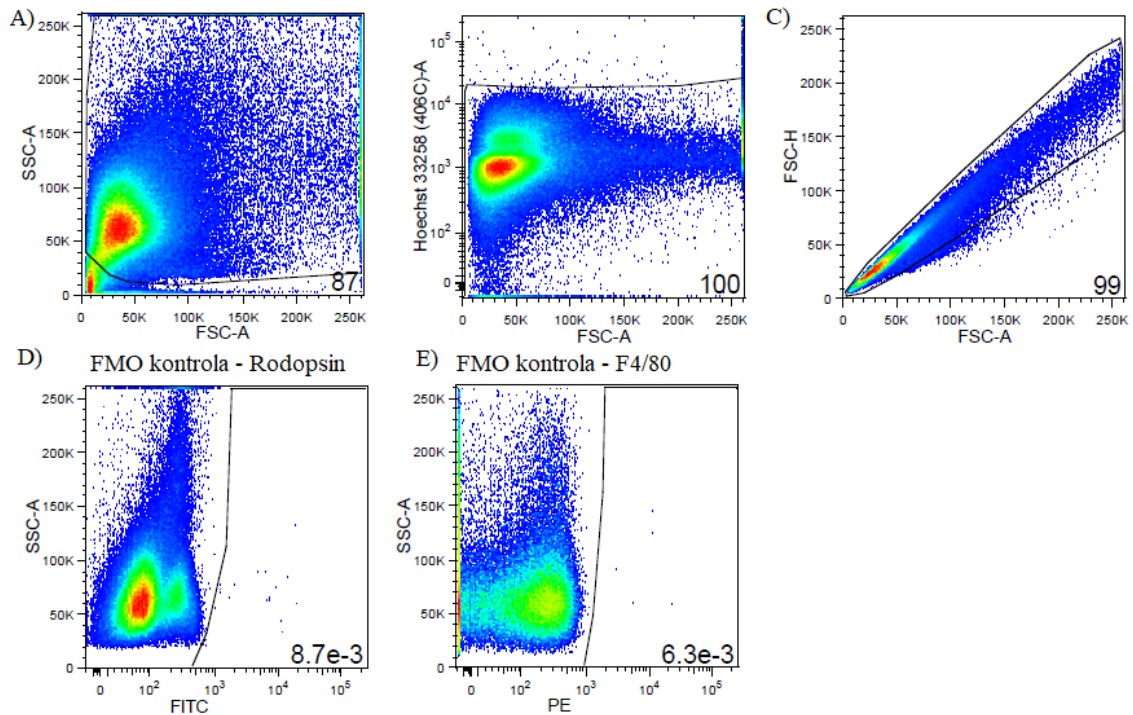
Pro značení buněk pozitivních pro rodopsin byly suspenze buněk ze sítnic přeneseny do mikrokultivační destičky s kulatým dnem a 3 min centrifugovány při 140 g. Pro značení mrtvých buněk bylo použito na každý vzorek 10 μ l roztoku Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) naředěného v PBS 1:200. Destička byla 30 minut inkubována ve tmě při 4 °C a následně promyta v PBS a centrifugována 3 min při 140 g. Pelety byly dále rozvolněny a bylo přidáno 100 μ l IC fixačního pufru (eBioscience) a vzorky byly inkubovány 30 min ve tmě při 4 °C. Poté byla destička promyta pomocí permeabilizačního

roztoku (eBioscience) a centrifugována 3 min při 270 g. Ke vzorkům pak byla přidána protilátka proti rodopsinu naředěná v permeabilizačním roztoku a destička byla opět inkubována 30 min ve tmě při 4 °C. Buňky byly promyty a resuspendovány ve 200 µl PBS.

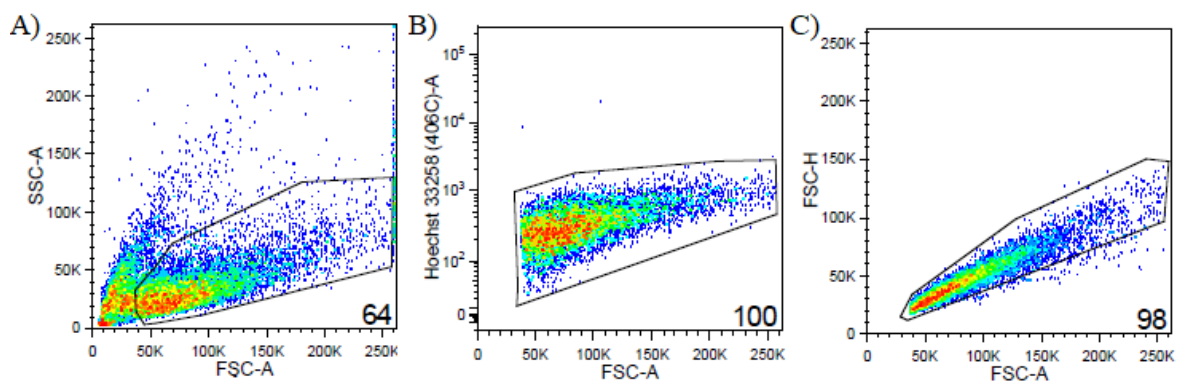
Vzorky byly měřeny pomocí cytometru LSR II. Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu FlowJo. Základní gatovací strategie pro vyhodnocení buněk sítnice a vyhodnocení MSC jsou uvedeny na **Obrázku 5.** a **Obrázku 6.**

Tabulka 2: Seznam použitých protilátek

Znak	Fluorochrom	Ředění	Klon protilátky	Výrobce	Značení
Rodopsin	FITC	1:50	4D2	Abcam	Intracelulární
F4/80	PE	1:50	BM8	BioLegend	Povrchové
CD54	FITC	1:50	YN1/1.7.4	BioLegend	Povrchové
CD44	APC	1:50	IM7	BioLegend	Povrchové
CD105	PE	1:50	MJ7/18	BioLegend	Povrchové
CD106	PE	1:50	429(MUCAM.A)	BioLegend	Povrchové
CD45	FITC	1:50	30-F11	BioLegend	Povrchové
CD11b	APC	1:50	M1.70	BioLegend	Povrchové
CD31	PE	1:50	MEC13.3	BioLegend	Povrchové



Obrázek 5. Reprezentativní dot ploty ukazující základní gatovací strategii pro vyhodnocení buněk sítnice. A) Buněčné události, B) Životnost buněk C) Singlety D) FMO kontrola-Rodopsin, E) FMO kontrola-F4/80



Obrázek 6. Reprezentativní dot ploty ukazující základní gatovací strategii pro vyhodnocení fenotypové charakterizace MSC. A) Buněčné události, B) Životnost buněk C) Singlety

5.19. Statistická analýza

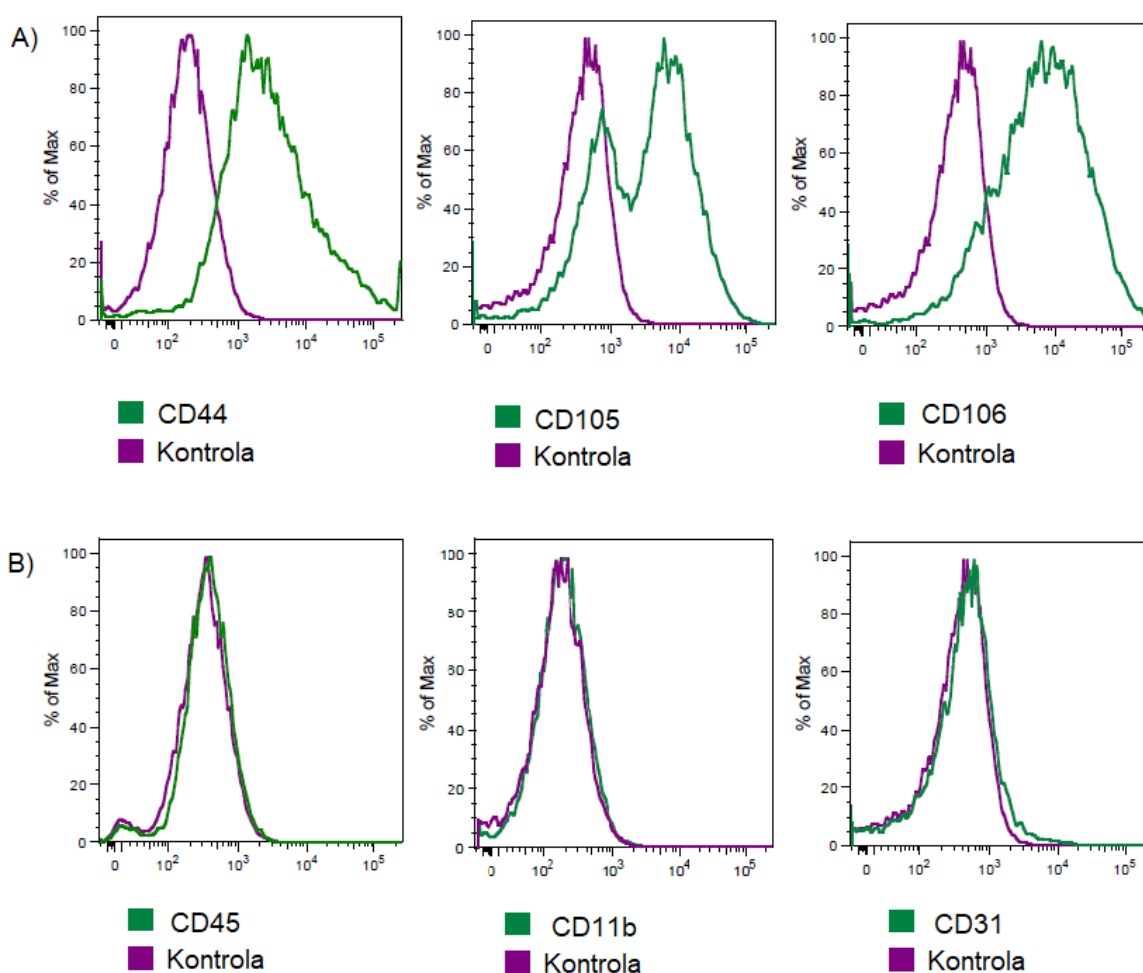
Data jsou uváděna jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou (SD, standart deviation). Pro vyhodnocení dat byl použit program GraphPad 8.0. Signifikantní stanovení pro srovnání dvou skupin bylo vypočítáno pomocí t-testu. Pomocí ANOVA testu byla stanovena srovnání více skupin. Za signifikantní byly považovány hodnoty ***P < 0,001; **P < 0,01 a *P < 0,05.

6. Výsledky

6.1. Charakteristika použitých MSC

6.1.1. Fenotypová charakterizace

V našich pokusech byly použity MSC izolované z kostní dřeně myši. Pomocí průtokové cytometrie jsme u těchto buněk stanovili expresi vybraných povrchových znaků. Jak je ukázáno na **Obrázku 7A**, použité MSC byly pozitivní na CD44, CD105, CD106 a neexprimovaly CD45, CD11b a CD31 (**Obrázek 7B**). Jak bylo popsáno v publikovaných článcích z naší laboratoře, tyto standartně připravované MSC pravidelně vykazovaly adhezenci k plastu a byly schopné diferenciace na adipocyty a osteoblasty (Svobodova et al., 2012).

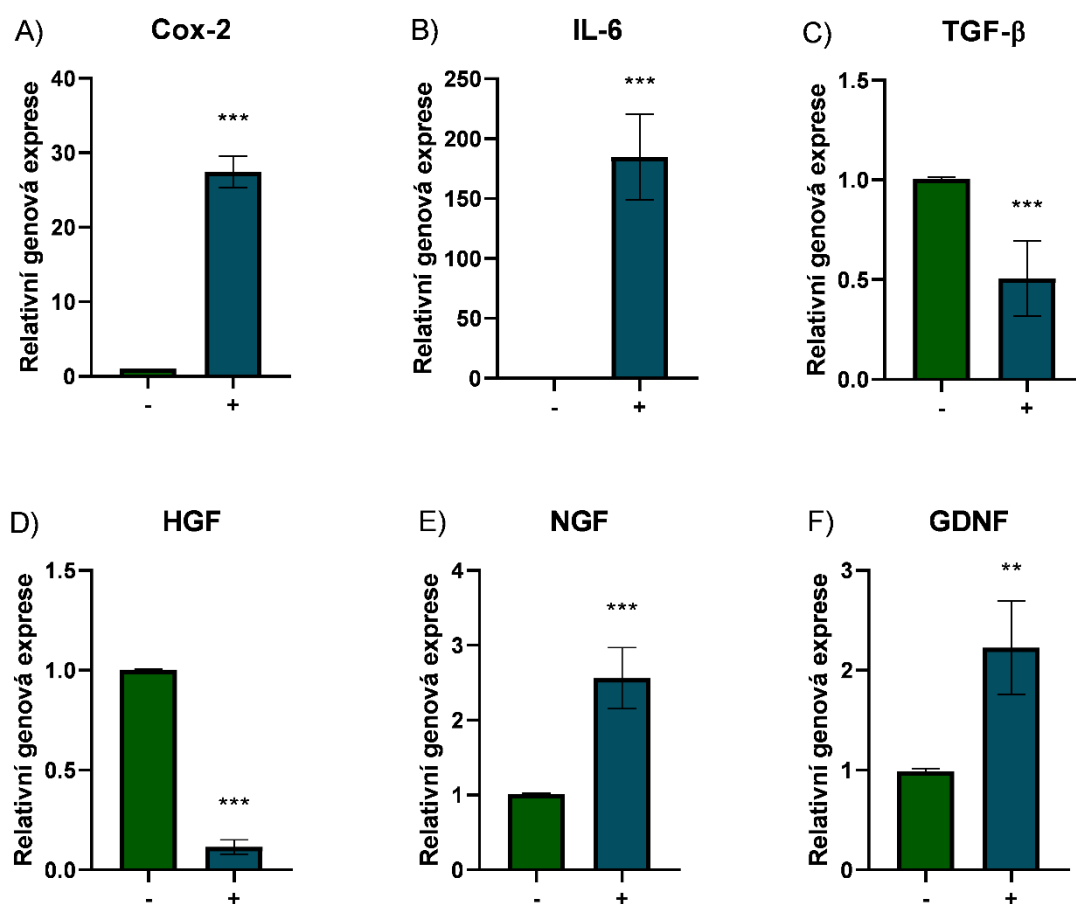


Obrázek 7: **Detekce povrchových znaků MSC.** Pomocí průtokové cytometrie byla u MSC stanovena exprese znaků CD44, CD105, CD106, CD45, CD11b a CD31.

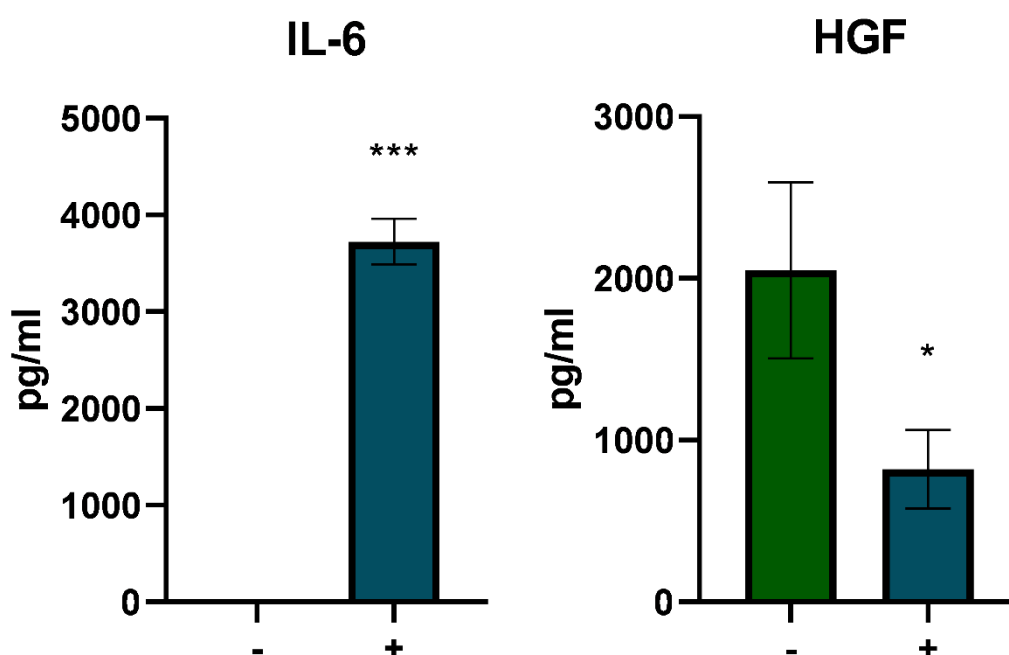
6.1.2. Exprese genů pro imunomodulační a růstové faktory u nestimulovaných a stimulovaných MSC

Důležitou vlastností MSC je jejich schopnost produkce řady imunomodulačních molekul a růstových faktorů. MSC stimulované prozánětlivými cytokiny IL-1 β , TNF- α a IFN- γ exprimovaly po 24 h geny pro imunomodulační molekuly Cox-2 a IL-6 (**Obrázek 8A, B**) a také u nich došlo ke zvýšení exprese genů pro růstové faktory NGF a pro faktor derivovaný z gliových buněk (GDNF, glial cell-derived neurotrophic factor) (**Obrázek 8E, F**). Naproti tomu MSC konstitutivně produkují TGF- β a HGF a exprese genů pro tyto faktory byla po stimulaci prozánětlivými cytokiny významně snížena oproti kontrolám (**Obrázek 8C, D**).

Stimulační nebo inhibiční efekt prozánětlivých cytokinů na expresi genů jsme ověřili na proteinové úrovni pomocí testu ELISA. Buňky byly kultivovány 48 h samotné nebo v přítomnosti IL-1 β , TNF- α a IFN- γ a pomocí ELISA testu byla prokázána zvýšená produkce IL-6 a snížená produkce HGF u stimulovaných buněk v porovnání s MSC kultivovanými v samotném mediu (**Obrázek 9**).



Obrázek 8: **Expresse genů pro imunomodulační a růstové faktory po stimulaci MSC prozánětlivými cytokiny.** MSC byly kultivované nestimulované (-), nebo v přítomnosti IL-1 β , TNF- α a IFN- γ (+). Expresse genů Cox-2 (A), IL-6 (B), TGF- β (C), HGF (D), NGF (E) a GDNF (F) byla měřena po 24 h metodou RT-PCR. Data představují průměr \pm SD ze 3 nezávislých pokusů. ***P < 0,001 a **P < 0,01 proti kontrole (-).

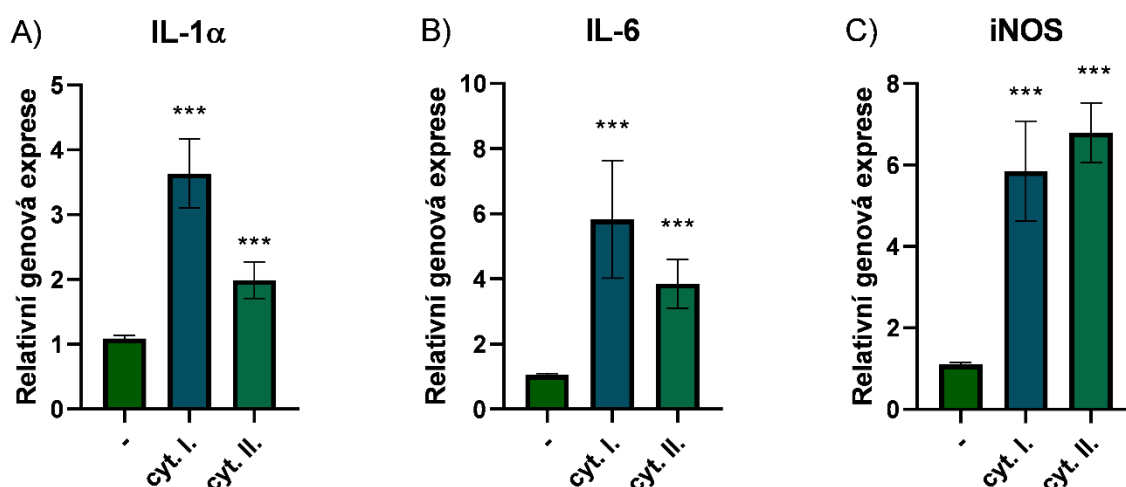


Obrázek 9: **Produkce IL-6 a HGF po stimulaci MSC prozánětlivými cytokiny.** Pomocí ELISA testu byly po 48 h měřeny koncentrace IL-6 a HGF u nestimulovaných MSC (-) a MSC stimulovaných IL-1 β , TNF- α a IFN- γ (+). Data představují průměr \pm SD ze 3 nezávislých pokusů. ***P < 0,001 a *P < 0,05 proti kontrole (-).

6.2. Vliv cytokinů na expresi genů pro prozánětlivé molekuly v explantátech sítnice

K prokázání, že buňky neuroretiny reagují na prostředí zánětu, jsme kultivovali explantáty sítnice v přítomnosti vybraných kombinací prozánětlivých cytokinů, které byly během patologických stavů detekovány ve sklivci pacientů. Buňky neuroretiny po 48 h této stimulace

exprimovaly zvýšené hladiny genů pro IL-1 α , IL-6 a iNOS oproti explantátům kultivovaným pouze v mediu (**Obrázek 10**).



Obrázek 10: Expresse genů pro IL-1 α , IL-6 a iNOS v explantátech sítnice v přítomnosti prozánětlivých cytokinů *in vitro*. Explantáty neuroretiny byly kultivovány 48 h samostatně (-) nebo v přítomnosti prozánětlivých cytokinů IFN- γ , IL-1 β , IL-17 (cyt. I.) a IFN- γ , TNF α , IL-17 (cyt. II.). Expresse genů pro IL-1 α (A), IL-6 (B) a iNOS (C) byly měřeny metodou RT-PCR. Data představují průměr \pm SD ze 4 nezávislých pokusů. ***P < 0,01 proti kontrole (-)

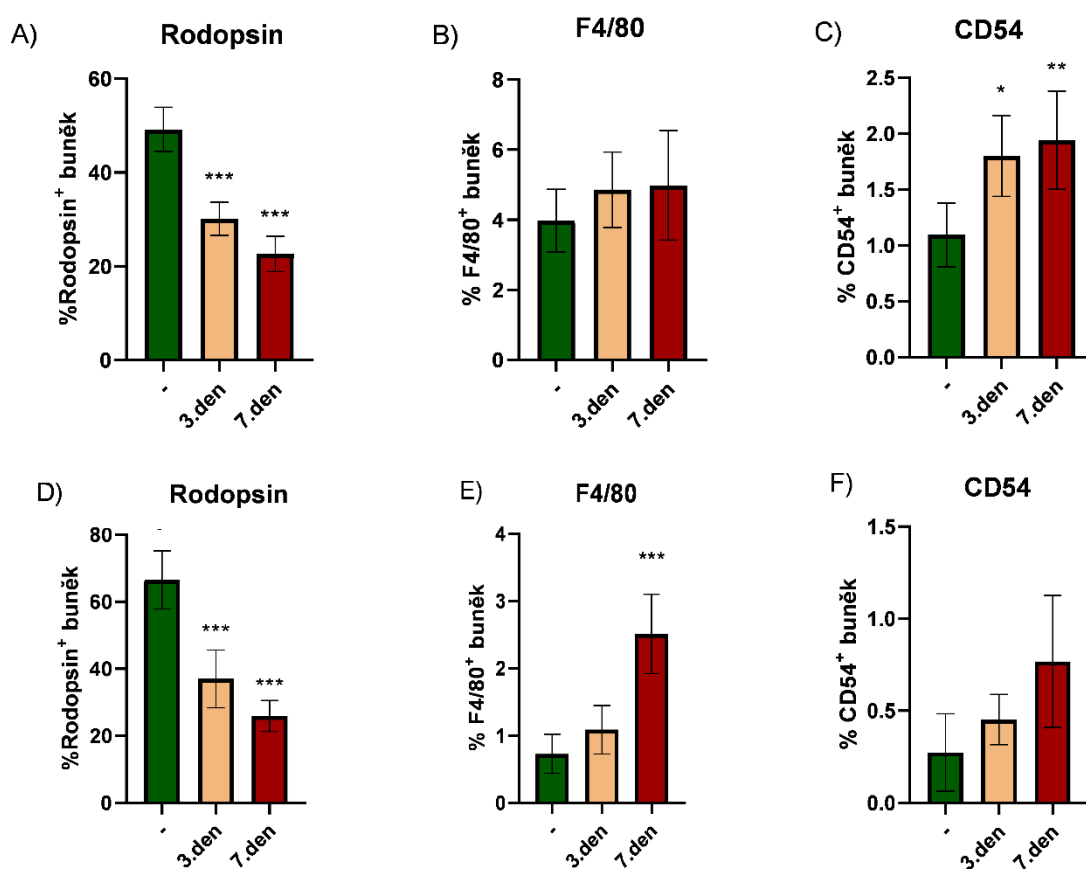
6.3. Model poškození sítnice podáním NaIO₃

6.3.1. Patologické změny v sítnici po aplikaci NaIO₃

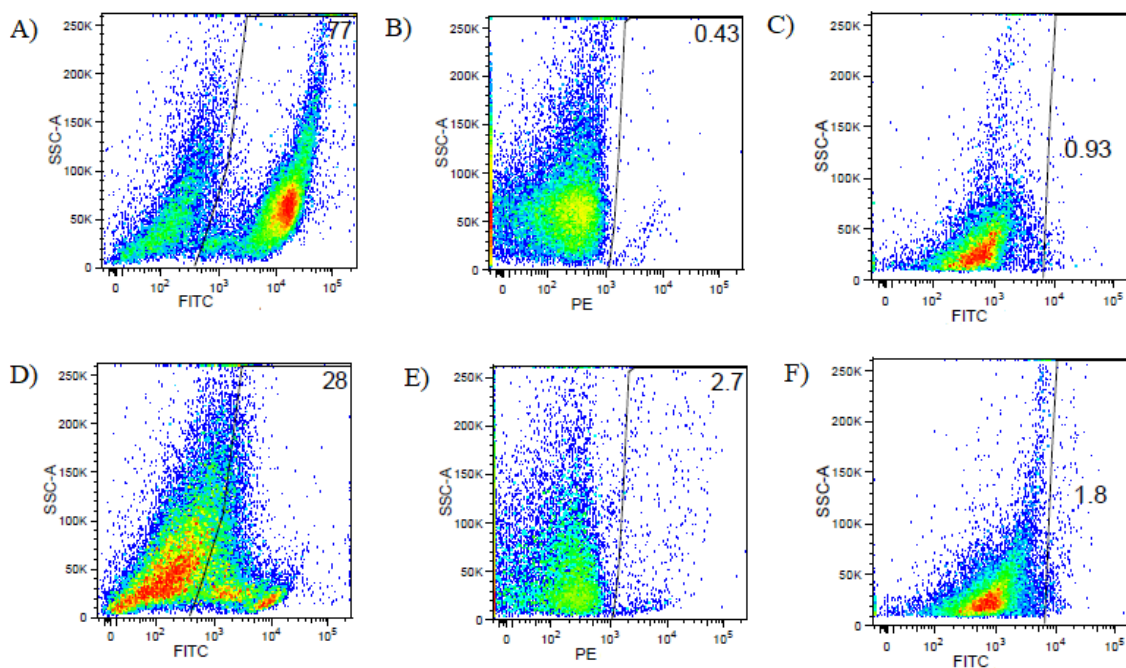
Pro indukci degenerace sítnice *in vivo* bylo myším i.p. podáno 50 mg/kg váhy NaIO₃. Po 3 a 7 dnech byl odebrán zadní segment oka, anebo pouze neuroretina, a pomocí průtokové cytometrie bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk pozitivních pro znak fotoreceptorů (rodopsin), makrofágů (F4/80) nebo pro adhezivní molekulu ICAM (CD54). Ke snížení počtu buněk exprimujících rodopsin došlo již 3. den od podání NaIO₃ a zastoupení těchto buněk bylo dále významně snižené 7. den (**Obrázek 11A, D**).

Třetí den po podání NaIO₃ jsme zaznamenali v oblasti zadního segmentu oka zvýšený počet buněk pozitivních pro F4/80 nebo CD54, a jejich procentuální zastoupení se dále výrazně neměnilo (**Obrázek 11B, C**). Naopak u neuroretiny jsme významnou infiltraci těchto buněk zaznamenali až 7. den, což naznačuje, že do této oblasti buňky imunitního systému migrují pomaleji (**Obrázek 11E, F**). Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli v dalších pokusech

zaměřit především na poškození v oblasti neuroretiny, kde dochází k infiltraci buňkami imunitního systému až v pozdější fázi rozvoje poškození (Obrázek 12).



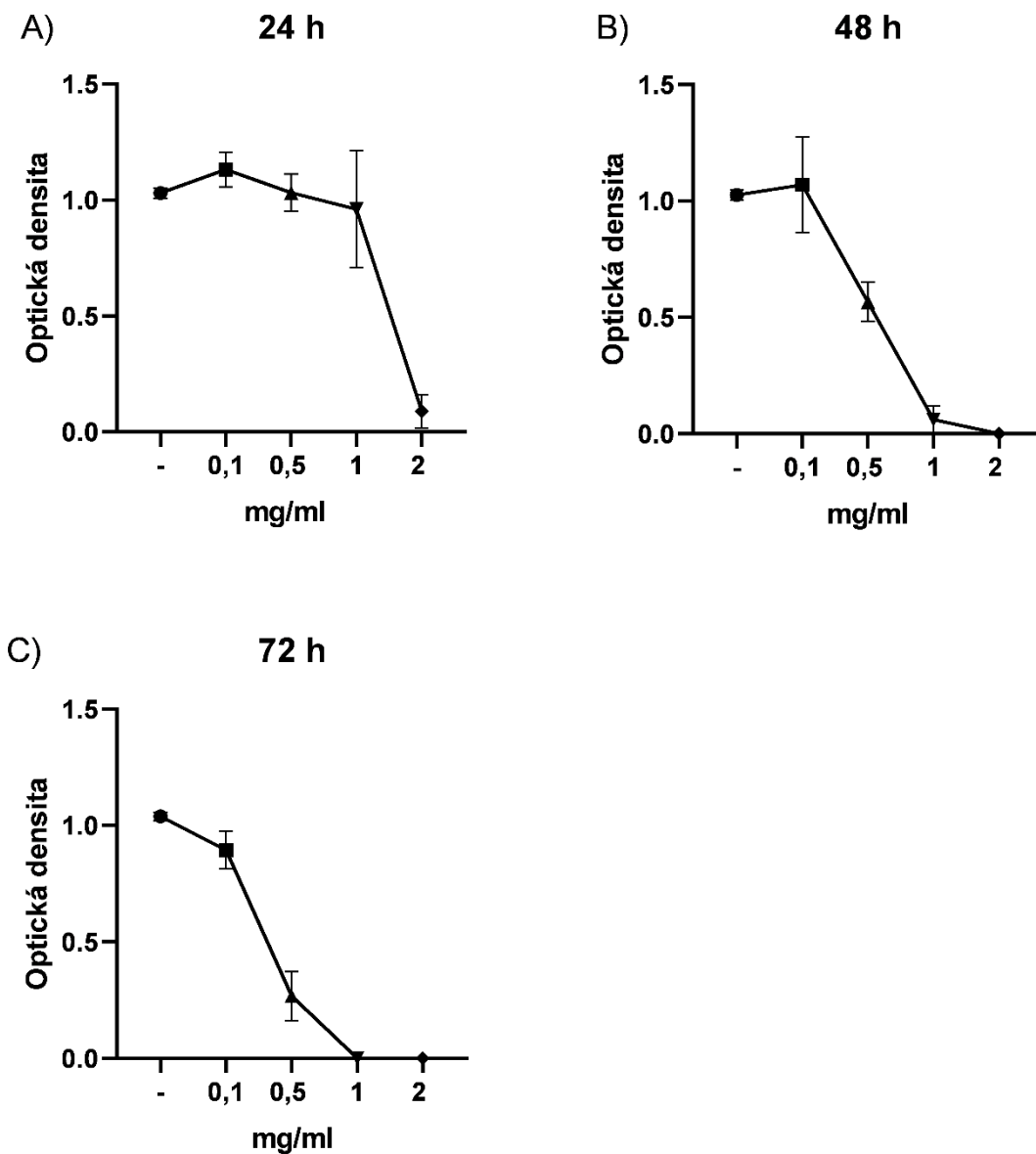
Obrázek 11: Zastoupení buněk pozitivních pro rodopsin, F4/80 nebo CD54 v zadním segmentu a neuroretině po aplikaci NaIO₃. Procenta buněk pozitivních pro rodopsin (A, D); F4/80 (B, E) a CD54 (C, F) byla měřena pomocí průtokové cytometrie v oblasti zadního segmentu oka (A, B, C) a neuroretiny (D, E, F) u zdravých myší (-) a myší, kterým bylo podáno i.p. NaIO₃, 3. a 7. den po aplikaci. Data představují průměr ± SD ze 3 nezávislých pokusů. ***P < 0,001; **P < 0,01 a *P < 0,05 proti kontrole (-).



Obrázek 12: **Reprezentativní dot ploty ukazující počet buněk pozitivních pro rodopsin, F4/80 nebo CD54 ve zdravé neuroretině a neuroretině poškozené působením NaIO₃.** Obrázek ukazuje počet buněk pozitivních na rodopsin (A), F4/80 (B) nebo CD54 (C) v neuroretině zdravé myši a počet buněk pozitivních pro rodopsin (D), F4/80 (E) nebo CD54 (F) v neuroretině 7. den po i.p. aplikaci NaIO₃.

6.3.2. Působení NaIO₃ na buňky sítnice *in vitro*

Působení NaIO₃ na metabolickou aktivitu buněk sítnic jsme stanovili pomocí WST-1 testu. V pokusech byly použity celé zadní segmenty oka kvůli vysoké toxicitě přímého působení chemikálie na samotnou neuroretinu. Metabolická aktivita buněk byla měřena v přítomnosti různých koncentrací NaIO₃ v čase 24, 48 a 72 h. Ukazuje se, že po 24 h působení dochází k prudkému poklesu metabolické aktivity buněk až při vysokých koncentracích (**Obrázek 13A**). Naopak po 72 h kultivace způsobuje NaIO₃ pokles metabolické aktivity buněk sítnice už při nízkých koncentracích (**Obrázek 13C**). V dalších pokusech jsme se rozhodli používat koncentraci 0,5 mg/ml NaIO₃, při které po 48 h docházelo pouze k částečnému snížení metabolické aktivity zadních segmentů oka (**Obrázek 13B**).



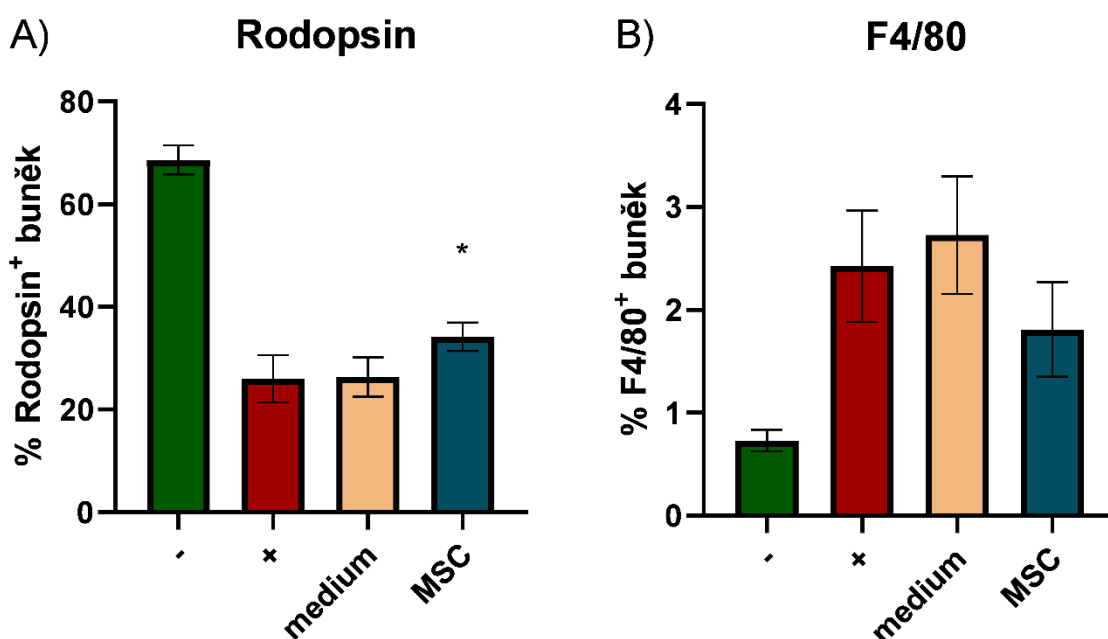
Obrázek 13: **Relativní metabolická aktivita měřená pomocí WST testu.** Zadní segmenty byly kultivovány 24 h (A), 48 h (B) a 72 h (C) pouze v mediu (-) nebo v přítomnosti uvedených koncentrací NaIO₃. Data jsou vyjádřena jako relativní metabolická aktivita (optická densita) a představují průměr ± SD ze 3 nezávislých pokusů.

6.4. Protektivní účinek MSC na neuroretinu poškozenou aplikací NaIO₃ *in vivo*

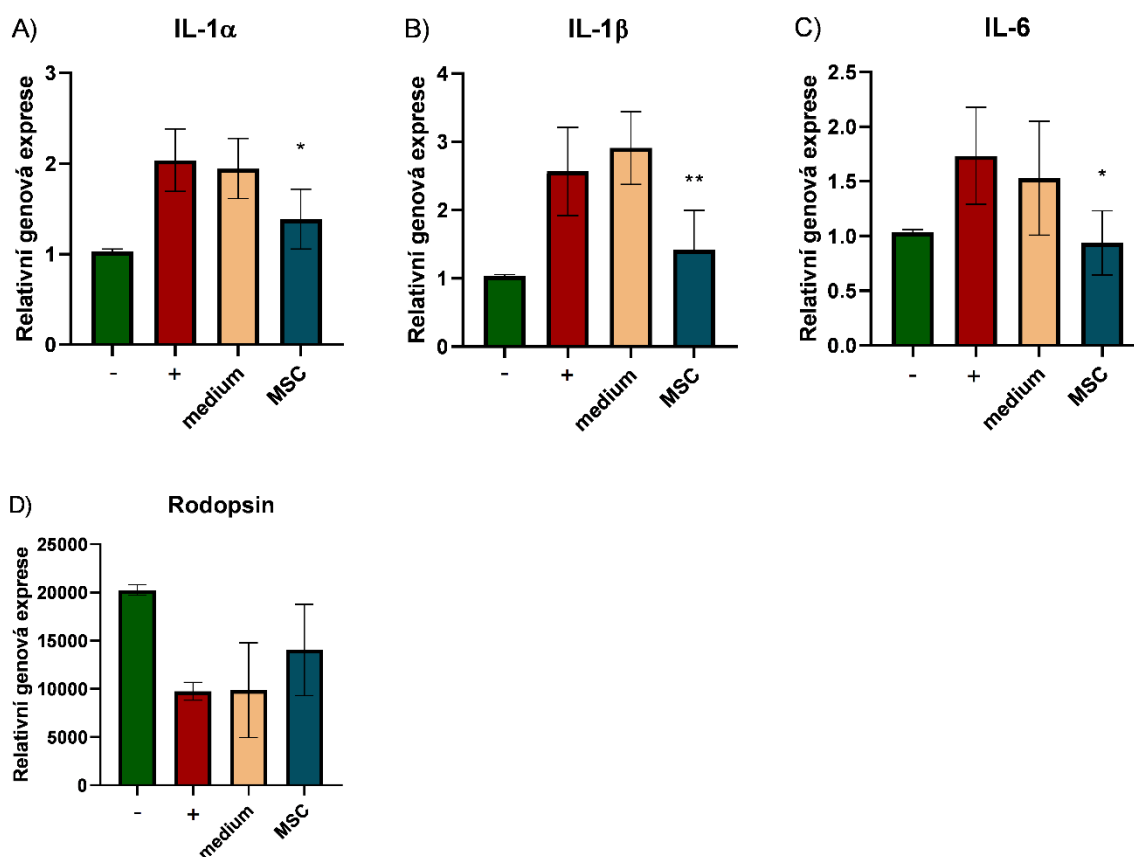
6.4.1. Lokální aplikace MSC

Pro charakterizaci terapeutického potenciálu MSC na poškozené buňky v oblasti neuroretiny bylo myším podáno intravitreálně do pravého oka 20 000 MSC v bezsérovém RPMI 1640 mediu. Druhé skupině myši bylo podáno do pravého oka pouze samotné bezsérové RPMI 1640 medium. Po 48 h bylo myším aplikováno i.p. NaIO₃ v množství 50 mg/kg váhy. Sedmý den od indukce poškození byla následně odebrána neuroretina a pomocí průtokové cytometrie bylo stanoveno množství buněk pozitivních pro rodopsin. Ukázali jsme, že podání MSC před indukcí degenerace sítnice mělo významný efekt na zvýšení počtu buněk vykazujících znak pro fotoreceptory oproti neléčenému oku. Při aplikaci samotného media však tento efekt pozorován nebyl (**Obrázek 14A**). Podobných výsledků jsme dosáhli také pomocí metody RT-PCR, kdy byla měřena v neuroretině exprese genu pro rodopsin (**Obrázek 15D**).

Podání MSC dále snižovalo počet makrofágů infiltrovaných v neuroretině (**Obrázek 14B**). Imunomodulační působení MSC v poškozené sítnici jsme také prokázali metodou RT-PCR, kdy jsme naměřili u oka s aplikovanými MSC snížení exprese genů pro IL-1 α , IL-1 β a IL-6 oproti neléčenému oku (**Obrázek 15A, B, C**).



Obrázek 14: Zastoupení buněk pozitivních pro rodopsin a F4/80 v neuroretině po lokální aplikaci MSC. Myšim bylo 48 h před i.p. podáním NaIO₃ do pravého oka aplikováno 20 000 MSC (MSC) nebo samotné medium (medium). Levé oko zůstalo bez lokální aplikace buněk (+). Jako kontrola byla použita sítnice zdravé myši (-). Procenta buněk pozitivních pro rodopsin (A) nebo pro F4/80 (B) byla stanovena pomocí průtokové cytometrie. Data představují průměr ± SD ze 4 nezávislých pokusů. *P < 0,05 proti kontrole (+).

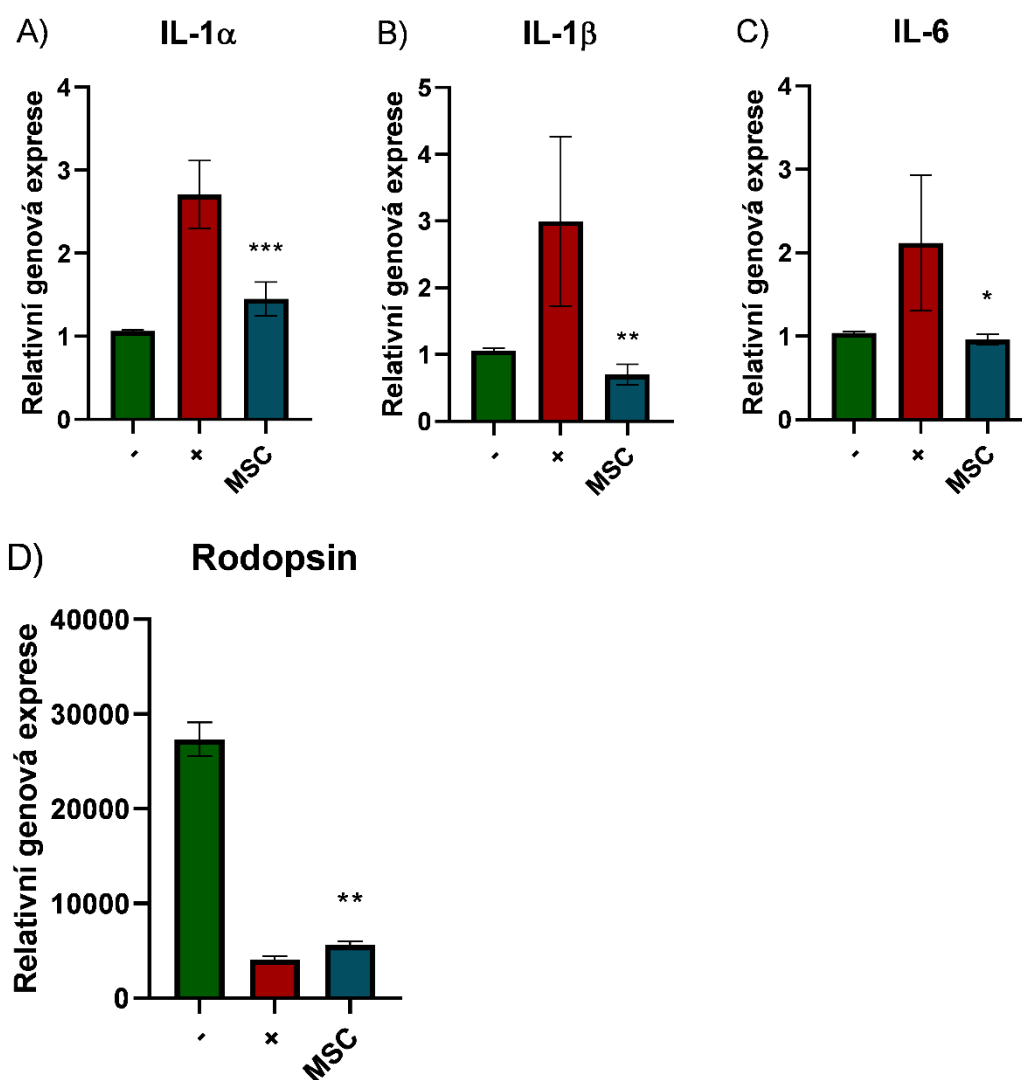


Obrázek 15: Expres genů pro prozánětlivé cytokiny a rodopsin v neuroretině po lokálním podání MSC 48 h před i.p. aplikací NaIO₃. Myšim bylo 48 h před i.p. aplikací NaIO₃ podáno do pravého oka 20 000 MSC (MSC) nebo samotné medium (medium). Levé oko zůstalo neošetřené (+). Jako kontrola byla použita sítnice zdravé myši (-). Data představují průměr ± SD ze 3 nezávislých pokusů, **P < 0,01 a *P < 0,05 proti (+).

6.4.2. Kultivace poškozené neuroretiny v přítomnosti MSC *in vitro*

Protektivní účinek MSC na poškozenou neuroretinu jsme dále testovali v *in vitro* systému. Po 7 dnech od i.p. podání NaIO₃, kdy už je neuroretina infiltrována buňkami imunitního

systému (**Obrázek 11E, F**), byly explantáty sítnic pravého oka kultivovány 48 h společně s MSC. Explantáty sítnic levého oka sloužily jako neléčená kontrola a byly kultivovány pouze v mediu. Pomocí metody RT-PCR jsme v buňkách sítnic změřili relativní expresi genů pro IL-1 α , IL-1 β a IL-6 a rodopsin. Zatímco neléčené sítnice vykazovaly zvýšené hladiny genové exprese pro IL-1 α , IL-1 β a IL-6, v přítomnosti MSC byla exprese těchto genů významně snížena. (**Obrázek 16A, B, C**). Naproti tomu exprese genu pro rodopsin byla signifikantně zvýšena (**Obrázek 16D**). Tyto výsledky ukázaly, že imunomodulační a zároveň i protektivní vlastnosti MSC jsou prokazatelné také v *in vitro* systému.



Obrázek 16: Relativní genová exprese v poškozené neuroretině při kultivaci 48 h s MSC. Neuroretina pravého oka myši po i.p. aplikaci NaIO₃ byla 48 h kultivována v přítomnosti 20 000 MSC (MSC), zatímco levá neuroretina byla kultivována pouze v mediu (+). Jako kontrola sloužila neuroretina ze zdravé myši kultivována 48 h v mediu (-). Expresie genů pro

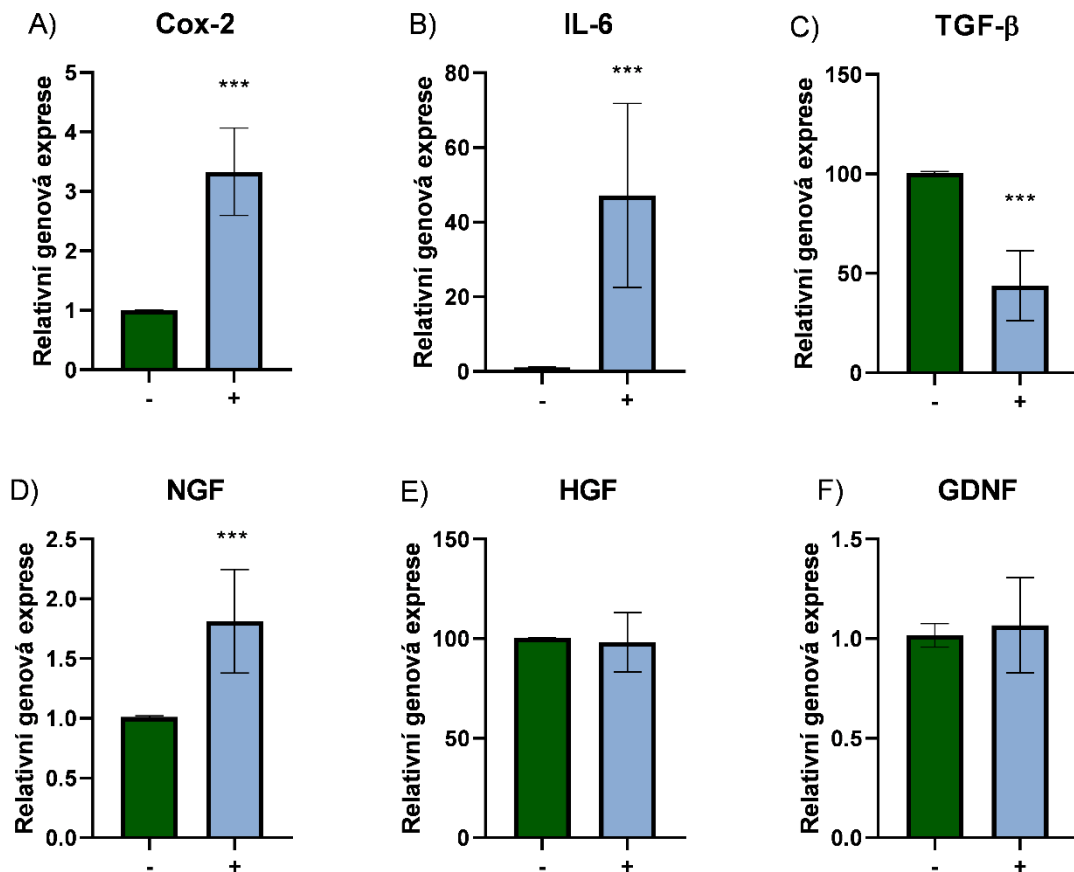
IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) a rodopsin (D) byly měřeny metodou RT-PCR. Data představují průměr \pm SD ze 4 nezávislých pokusů. ***P < 0,001, **P < 0,01 a *P < 0,05 proti (+).

6.5. Protektivní účinek MSC na zadní segment kultivovaný v přítomnosti NaIO₃ *in vitro*

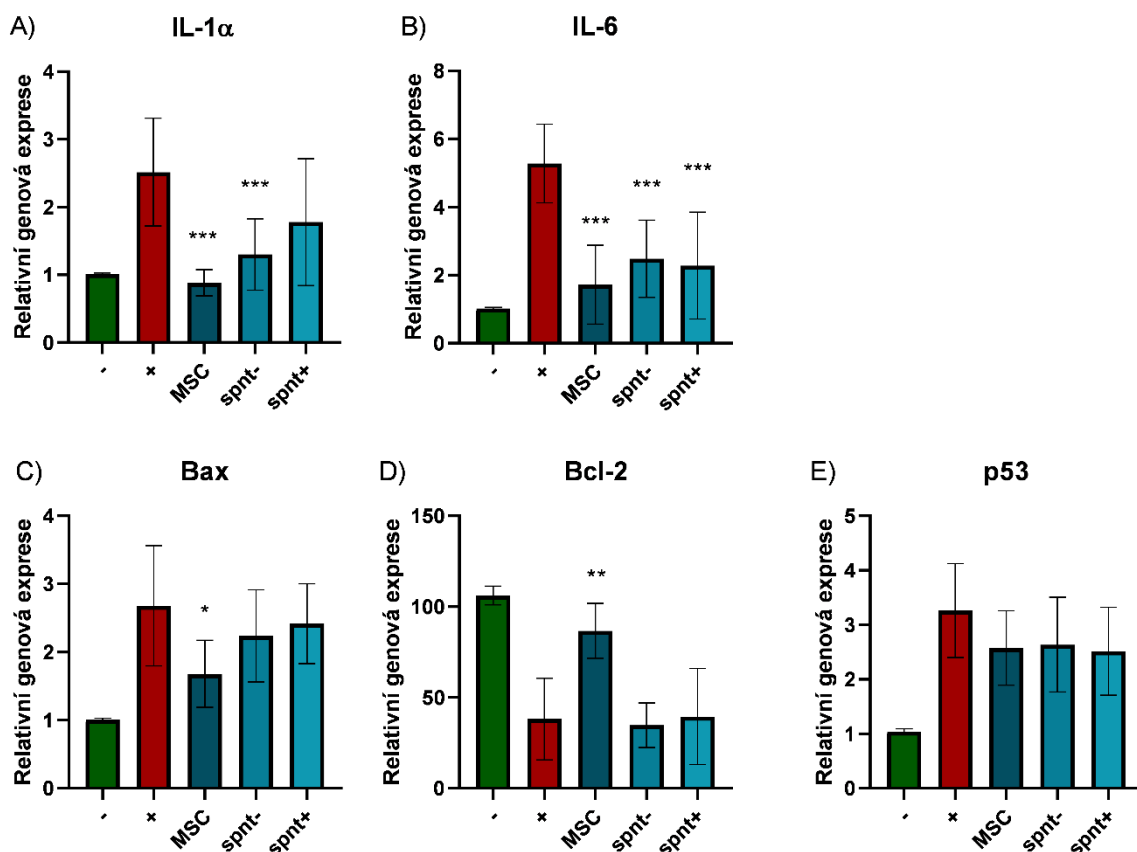
6.5.1. Vliv MSC a supernatantů na expresi genů při kultivaci zadního segmentu v přítomnosti NaIO₃

Pro další charakterizaci mechanismu působení MSC na poškozené explantáty sítnic, jsme kultivovali zadní segmenty oka společně s MSC 48 h v přítomnosti NaIO₃ o koncentraci 0,5 mg/ml. Parakrinní efekt byl testován použitím supernatantu získaného po kultivaci MSC. Při přípravě supernatantů byly MSC kultivovány samostatně nebo v přítomnosti prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IFN- γ a TNF- α , které navozují u těchto buněk imunomodulační vlastnosti a produkci řady neuroprotektivních faktorů. Po 24 h byly buňky důkladně opláchnuty od přidaných cytokinů a následně kultivovány v mediu RPMI 1640. Po 48 h byl odebrán supernatant a dále kultivován se zadním segmentem sítnic v přítomnosti 0,5 mg/ml NaIO₃. Z takto stimulovaných MSC bylo také provedeno pomocí metody RT-PCR stanovení genové exprese pro imunomodulační a růstové faktory. Ukázali jsme, že poté, co došlo k výměně media, byly MSC schopné exprimovat oproti nestimulované kontrole zvýšené hladiny Cox-2, IL-6 a NGF (**Obrázek 17A, B, D**). Naopak jsme naměřili snížení exprese pro TGF- β (**Obrázek 17C**). U HGF a GDNF nebyl v tomto pokusu rozdíl mezi kontrolami a stimulovanými buňkami (**Obrázek 17E, F**).

Kultivace zadních segmentů s NaIO₃ způsobila u zvýšení genové exprese pro IL-1 α a IL-6 (**Obrázek 18A, B**). Zároveň také došlo ke zvýšení exprese genů pro proapoptické molekuly Bax a p53 (**Obrázek 18C, E**) a snížení exprese antiapoptického Bcl-2 (**Obrázek 18D**). Přítomnost MSC však snížila hladiny exprese genů pro IL-1 α a IL-6 a také došlo ke snížení apoptózy u buněk zadního segmentu oka. Při použití supernatantu z MSC jsme naměřili snížení genové exprese pro IL-1 α a IL-6, a to při použití supernatantu z buněk nestimulovaných i stimulovaných. U molekul hrajících roli v procesu apoptózy však nebyly v tomto případě naměřeny významné změny. Tyto výsledky ukazují, že MSC hrají roli ve snížení apoptózy a zároveň mohou působit parakrinním způsobem při regulaci imunitní odpovědi.



Obrázek 17: Expresse genů pro imunomodulační a růstové faktory u MSC po 24 h stimulace a následné kultivace 48 h pouze v mediu. MSC byly kultivovány 24 h samostatně (-), nebo v přítomnosti prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IFN- γ a TNF- α (+). Buňky byly následně opláchnuty a kultivovány pouze v mediu 48 h. Expresse pro Cox-2 (A), IL-6 (B), TGF- β (C), NGF (D), HGF (E) a GDNF (F) byly měřeny metodou RT-PCR. Data představují průměr \pm SD ze 3 nezávislých pokusů. ***P < 0,001 proti kontrole (-).



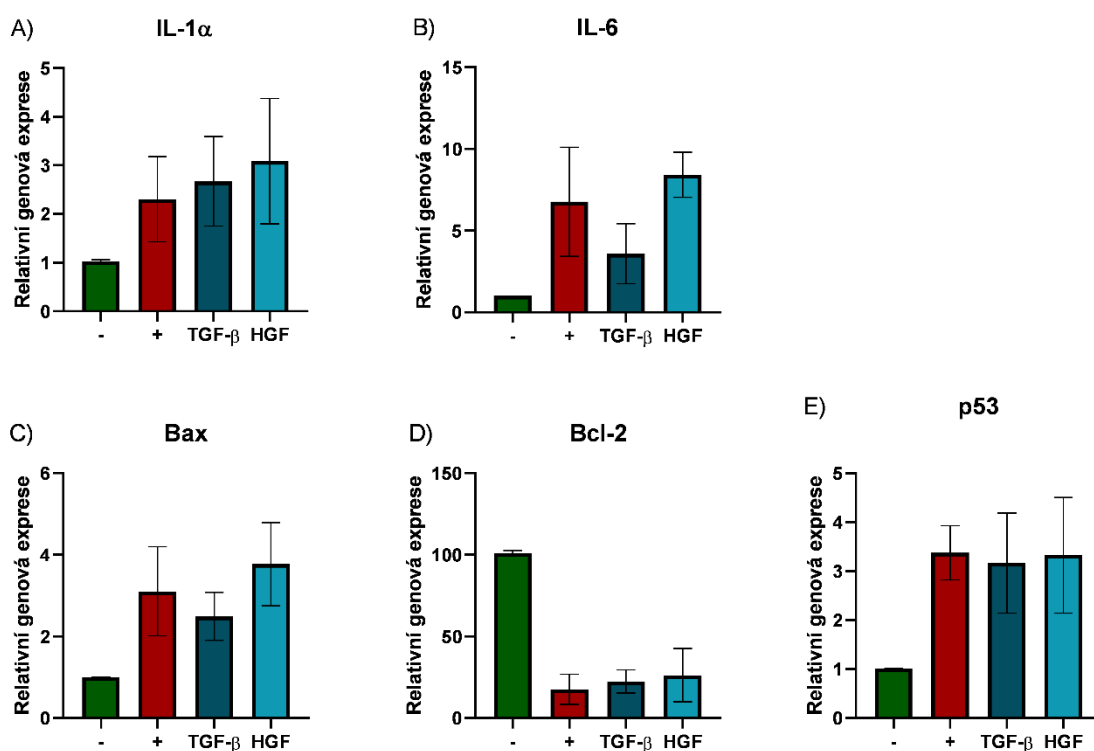
Obrázek 18: Kultivace zadního segmentu oka s NaIO₃ v přítomnosti MSC nebo supernatantů po kultivaci MSC. Zadní segmenty oka byly kultivovány pouze v mediu (-), v přítomnosti 0,5 mg/ml NaIO₃ (+), v přítomnosti NaIO₃ a MSC (MSC), anebo v přítomnosti NaIO₃ a supernatantu z nestimulovaných MSC (spnt-) nebo v přítomnosti NaIO₃ a supernatantu z MSC stimulovaných 24 h prozánětlivými cytokiny a následně kultivovaných v mediu bez cytokinů (spnt+). Expres genů pro IL-1α (A), IL6 (B), Bax (C), Bcl-2 (D) a p53 (E) byla měřena metodou RT-PCR. Data představují průměr ± SD z 5 nezávislých pokusů.

***P < 0,001, **P < 0,01 a *P < 0,05 proti (+)

6.5.2. Vliv cytokinů produkovaných MSC na expresi genů při kultivaci zadního segmentu v přítomnosti NaIO₃

MSC konstitutivně produkují vysoké hladiny TGF-β a HGF (Obrázek 8C, D). Tyto dva cytokiny by proto mohly hrát roli v regulačních a protektivních mechanismech působení MSC na poškozené buňky sítnice.

Zadní segmenty oka byly kultivovány pouze v mediu, v přítomnosti NaIO₃ nebo v přítomnosti NaIO₃ společně s 0,5 ng/ml TGF-β případně 10 ng/ml HGF. Po 48 h byly u explantátů sítnic měřeny pomocí metody RT-PCR exprese genů pro IL-1α, IL-6, Bax, Bcl-2 a p53. TGF-β způsobilo snížení exprese genu pro IL-6 (**Obrázek 19B**), a mírné snížení exprese genu pro Bax (**Obrázek 19C**), u ostatních měřených molekul jsme však podobný významný efekt nezaznamenali (**Obrázek 19A, D, E**). Výsledky tak naznačují, že TGF-β má roli v parakrinním působení MSC na expresi prozánětlivých cytokinů v poškozené sítnici (**Obrázek 18**), výsledný efekt je však závislý na více faktorech.



Obrázek 19: Vliv cytokinů TGF-β a HGF na expresi genů při kultivaci zadního segmentu v přítomnosti NaIO₃. Zadní segmenty oka byly kultivovány pouze v mediu (-), v přítomnosti NaIO₃ (+), v přítomnosti NaIO₃ a TGF-β (TGF-β) nebo v přítomnosti NaIO₃ a HGF (HGF). Exprese genů pro IL-1α (A), IL6 (B), Bax (C), Bcl-2 (D) a p53 (E) byla měřena metodou RT-PCR. Data představují průměr ± SD ze 4 nezávislých pokusů.

7. Diskuze

Degenerativní onemocnění sítnice představují hlavní příčinu ztráty zraku u dospělých pacientů. V současné době, kdy pro tyto patologické stavy stále není dostupná dostatečně účinná léčba, představuje perspektivní možnost využití buněčné terapie založené na aplikaci kmenových buněk. Pro terapeutické účely se ukazuje vhodné použití především MSC, které byly detekovány v celé řadě tkání dospělého organismu, a u kterých kromě schopnosti diferenciaci a migrace do místa poškození bylo prokázáno imunomodulační a neuroprotektivní působení. Ukázali jsme, že MSC izolovány z kostní dřeně myši konstitutivně produkují TGF- β a HGF. Po 24 h stimulace *in vitro* reagují na prostředí prozánětlivých cytokinů zvýšenou expresí genů pro Cox-2, IL-6, NGF a GDNF.

U degenerativních onemocnění sítnice má kromě samotného poškození buněk roli také lokální zánětlivá reakce a zvýšení produkce prozánětlivých cytokinů. Důležitou úlohu zde hrají především makrofágy a také tvorba inflamazómu a následná produkce IL-1 β . Dalším členem této rodiny cytokinů, který se může vyskytovat v poškozené sítnici, je IL-1 α , který působí jako signál nebezpečí, vede k buněčné smrti a tvorbě sterilního zánětu. Působení IL-6 se ukazuje jako klíčové pro zvýšenou angiogenezi, porušení bariéry oka a také infiltraci buněk imunitního systému. U pacientů s degenerativním poškozením sítnice jsou dále ve sklivci zaznamenány zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů, jako je IL-17 a TNF- α (Mesquida et al., 2019; Nassar et al., 2014; Wooff et al., 2019). Buňky sítnice jsou schopné reagovat na prostředí zánětu změnou sekrece cytokinů. Prokázali jsme, že při *in vitro* stimulaci kombinacemi prozánětlivých cytokinů zvýšily explantáty sítnic po 48 h kultivace expresi genů pro IL-1 α , IL-6 a iNOS.

Pro studium degenerativních onemocnění sítnice bylo zavedeno několik experimentálních modelů. Jednou z možností, jak indukovat degeneraci sítnice, je využití chemicky vyvolaného poškození. Lokálně je možné aplikovat například NMDA nebo chlorid kobaltnatý, což vede k poškození nervových buněk oka (Niwa et al., 2016). Dalším způsobem, jak navodit degeneraci sítnice, je aplikace NaIO₃, který může být podán nejen lokálně, ale také intraperitoneálně.

Ukázali jsme, že podobně, jako v publikovaných pracích (Chowers et al., 2017; Moriguchi et al., 2018), došlo u myši po podání NaIO₃ v množství 50 mg/kg váhy ke snížení zastoupení buněk nesoucích znak pro fotoreceptory a naopak k akumulaci makrofágů (F4/80 pozitivních buněk). Dále jsme zaznamenali, že k infiltraci buňkami imunitního systému do oblasti nervové části sítnice dochází až v pozdější fázi degenerativního procesu. Sedmý den od indukce

degenerace sítnice byly u buněk neuroretiny zaznamenány zvýšené hladiny exprese genů pro IL-1 α , IL-1 β a IL-6, které mohou hrát u degenerativních onemocnění sítnice důležitou roli.

NaIO₃ působí na buňky sítnic také *in vitro*. Lidská buněčná linie RPE buněk ARPE-19 reaguje na NaIO₃ zvýšenou produkcí IL-1 β a zároveň dochází ke zvýšení apoptózy buněk (Hanus et al., 2016; Juel et al., 2013; Mao et al., 2018). Přítomnost NaIO₃ během kultivace neuroretiny je již v nízkých koncentracích vysoce toxická. Proto jsme pro tyto pokusy použili celý zadní segment oka s neporušenou vrstvou RPE buněk. Při zvyšující se koncentraci NaIO₃ docházelo ke snižování metabolické aktivity buněk sítnice. Zároveň jsme naměřili po 48 h kultivace zvýšenou expresi genů pro IL-1 α , IL-6 a proapoptické molekuly. Došlo také k velmi výraznému snížení exprese genu pro rodopsin, naznačující, že NaIO₃ má *in vitro* negativní efekt především na fotoreceptory.

Terapeutické využití MSC pro léčbu degenerativních onemocnění sítnice bylo testováno v několika klinických studiích, zaměřených především na bezpečnost jejich použití (Park et al., 2014; Siqueira et al., 2015, Weiss and Levy 2018). Labrador-Velandia et al., (2018) a Vilela et al. (2018) v experimentálním modelu ukázali, že lokálně aplikované MSC mohou být v oku nalezeny i několik týdnů po podání. *In vitro* bylo prokázáno, že MSC se mohou diferencovat v buňky vykazující znaky buněk sítnice (Hermankova et al., 2017; Moviglia et al., 2012). Na poškozené sítnicové buňky mohou MSC pozitivně působit i parakrině produkcí růstových faktorů, jako je například NGF a FGF (Ezquer et al., 2016; Millán-Rivero et al., 2018). Při podání MSC 48 h před indukci degenerace sítnice pomocí NaIO₃ jsme použitím průtokové cytometrie naměřili v léčeném oku vyšší zastoupení buněk pozitivních pro znak fotoreceptorů a zároveň (pomocí metody RT-PCR) vyšší hladinu exprese genu pro rodopsin, oproti oku, které nebylo předem ošetřené. Tento efekt by mohl být způsoben protektivním působením na buňky sítnice produkcí neuroprotektivních faktorů. Podobných výsledků jsme dosáhli také *in vitro* kultivací poškozené neuroretiny v přítomnosti MSC. Po 48 h kokultivace jsme zaznamenali vyšší expresi genu pro rodopsin v porovnání s neuroretinou kultivovanou samostatně.

Dalším cílem léčby degenerativních onemocnění sítnice je regulace lokální imunitní odpovědi. V poškozené sítnici dochází například k tvorbě inflamazómu, apoptóze buněk a také zvýšené angiogenezi. Regulace těchto mechanismů pomocí MSC by tak mohla být jedním z cílů terapie. V našem modelu jsme v neuroretině po i.p. podání NaIO₃ zaznamenali po 7 dnech zvýšený výskyt makrofágů (F4/80 pozitivní buňky). V buňkách neuroretiny došlo také k výraznému nárůstu exprese genů pro IL-1 α a IL-1 β . Tento efekt však byl snížen lokální aplikací MSC 48 h před indukci degenerace sítnice. U pacientů s DR byla detekována ve sklivci

zvýšená hladina IL-6 a zároveň také solubilních podjednotek receptoru pro tento cytokin sIL-6R, který rozeznává IL-6, a glykoproteinu 130 zajišťujícího signalizaci do buňky. Tyto tři molekuly mohou vyústit v trans-signalizaci, která dále vede k zánětlivé odpovědi (Chen et al., 2016). V našem modelu jsme zaznamenali v buňkách sítnice po 7 dnech od indukce degenerace významně vyšší expresi genu pro IL-6 oproti zdravým myším. Lokální podání MSC snížilo u buněk neuroretiny expresi genu pro tento cytokin a podobných výsledků bylo také dosaženo při kultivaci *in vivo* poškozených explantátů sítnic v přítomnosti MSC *in vitro*.

Obdobně, jako u poškození sítnice *in vivo*, působily MSC na zadní segmenty, izolované ze zdravých myší, kultivované v přítomnosti NaIO₃. Také zde došlo v přítomnosti MSC k inhibici zvýšené exprese genů pro IL-1 α a IL-6 oproti zadním segmentům kultivovaným samostatně. Zvýšení exprese genů pro IL-1 β buňkami zadního segmentu oka kultivovaného společně s NaIO₃ jsme v tomto *in vitro* modelu nezaznamenali. Podařilo se nám však u buněk sítnice naměřit vyšší hodnoty pro proapoptické molekuly Bax a p53 oproti kontrolám. Naopak exprese genu pro antiapoptické molekuly Bcl-2 byla snížena. MSC částečně inhibovaly apoptózu, což bylo prokázáno snížením exprese genu proapoptické molekuly Bax, a naopak zvýšení exprese genů pro antiapoptickou molekulu Bcl-2 u zadních segmentů oka. Nenaměřili jsme však změny v expresi genu pro rodopsin u explantátů kultivovaných společně s MSC oproti explantátům kultivovaným pouze s NaIO₃. To může být způsobeno příliš toxickým přímým působením NaIO₃ na fotoreceptory.

Možnosti parakrinního účinku MSC na buňky sítnice jsme ověřili využitím supernatantu získaného kultivací MSC. Použili jsme supernatant získaný z kultur nestimulovaných MSC a z MSC, které byly 24 h stimulovány prozánětlivými cytokiny a následně opláchnuty a kultivovány dalších 48 h pouze v mediu. Obě varianty supernatantů MSC snižovaly nárůst hladin exprese genů pro IL-1 α a IL-6 způsobené NaIO₃. Nezaznamenali jsme však efekt na molekuly účastnící se apoptózy. Jedním z důvodů může být, že MSC produkují neuroprotektivní faktory v přítomnosti prozánětlivých cytokinů a pouze 24 h stimulace a následná kultivace v samotném mediu nebyla dostačující. Naopak imunomodulační molekula TGF- β je produkována konstitutivně, a proto by mohla hrát roli v parakrinním působení MSC na regulaci zánětu v explantátech sítnic.

Mao et al. (2018) ukázali, že lidská buněčná linie ARPE-19 kultivovaná v přítomnosti NaIO₃ vykazovala zvýšenou apoptózu oproti kontrolní skupině. Kokultivace buněčné linie s MSC oddělena pomocí inzertu, však tento efekt inhibovala. NaIO₃ způsobilo dále u ARPE-19 buněčné linie zvýšení IL-1 β . Ten může stimulovat MSC k produkci růstových faktorů, jako je

například epidermální růstový faktor, FGF a HGF (Broekman et al., 2016). To naznačuje, že MSC mohou působit antiapopticky na poškozené RPE buňky parakrinním způsobem. Vzhledem k tomu, že poškození RPE vrstvy, která zajišťuje transport živin do sítnice, vede k degeneraci i dalších buněčných typů, mohlo by být perspektivní možností buněčné terapie zaměřit se především na ochranu, případně i nahrazení, těchto buněk.

Potenciální efekt TGF- β , který je produkovaný konstitutivně MSC, a mohl by proto hrát roli v jejich parakrinním působení, jsme testovali v *in vitro* systému. Po intravitreálním podání MSC do poškozeného oka potkanů naměřili Emre et al. (2015) a Millán-Rivero et al. (2018) lokální zvýšení TGF- β oproti neléčeným jedincům. Fisichella et al. (2016) ukázali, že podání TGF- β snížilo hladinu proapoptické molekuly Bax v sítnici v experimentálním modelu AMD. V našem *in vitro* modelu kultivace zadního segmentu společně s NaIO₃ v přítomnosti TGF- β vedla pouze k mírnému snížení exprese genu pro tento proapoptický faktor. Naměřili jsme ale změny v expresi genu pro IL-6. Efekt působení samotného TGF- β však byl nižší než při společné kokultivaci zadních segmentů oka s MSC.

Druhým cytokinem, jehož působení na poškozené sítnicové buňky jsme měřili, byl HGF. Ohtaka et al. (2016) ukázali protektivní efekt lokálně podaného HGF na degeneraci RPE vrstvy a fotoreceptorů. V modelu kultivaci zadních segmentů s NaIO₃ v přítomnosti HGF se nám však nepodařilo prokázat snížení exprese proapoptických genů v buňkách sítnice. Exprese genů pro IL-1 α a IL-6 byla dokonce v tomto případě vyšší než v buňkách, které byly kultivovány pouze s NaIO₃.

Ukázali jsme, že intravitreální podání MSC má protektivní účinek na degeneraci buněk sítnice a na regulaci nežádoucí lokální imunitní reakce. V *in vitro* systému jsme zjistili, že MSC mohou působit imunomodulačně svým parakrinním působením a určitou roli v tomto efektu může hrát produkce TGF- β . Kromě produkce molekul modulujících imunitní odpověď a produkce růstových faktorů však mohou MSC působit na poškozenou sítnici i dalšími způsoby. U DR dochází v kapilárách sítnice ke ztrátě pericytů, které jsou důležité pro udržení homeostázy a udržení správné funkce cévního zásobení. Mendel et al. (2013) prokázali integraci lokálně podaných MSC do vaskulatury sítnice u myšího modelu DR. Podané buňky by tak mohly působit také jako náhrada poškozených pericytů a stabilizovat kapiláry sítnice. Jinou možností by mohlo být také snížení produkce ROS v sítnici podáním MSC (Ezquer et al., 2016).

Tyto výsledky ukazují, že aplikace MSC mohou být vhodná terapie pro doposud neléčitelné degenerativní onemocnění sítnice, jako je například AMD, DR, RP nebo glaukom, a přispět tak ke zlepšení kvality života pacientů s tímto typem onemocnění.

8. Závěr

MSC v našich pokusech splňovaly kritéria stanovená Mezinárodní komisí pro buněčnou terapii. Pomocí metody FACS jsme u nich prokázali expresi povrchových znaků CD44, CD105 a CD106. Použité MSC však neexprimovaly znaky hematopoetických buněk CD45, CD11b a CD31. Stimulace cytokiny IFN- γ , IL-1 β a TNF- α vedla ke zvýšení exprese genů pro Cox-2, IL-6 a pro růstové faktory NGF a GDNF. Vysoké hladiny TGF- β a HGF produkují MSC konstitutivně a stimulace prozánětlivými cytokiny vede naopak ke snížení produkce těchto faktorů na genové úrovni. Produkci vybraných cytokinů (IL-6 a HGF) na úrovni proteinů jsme ověřili také metodou ELISA.

Jako experimentální model pro farmakologicky navozené degenerativní poškození sítnice byla použita aplikace NaIO₃. Využitím metody FACS jsme ukázali, že 7 dní po i.p. podání NaIO₃ dochází u myši k poklesu počtu buněk pozitivních pro rodopsin, a naopak k infiltraci sítnice buňkami pozitivními pro F4/80. Analýzou genové exprese jsme dále zaznamenali v poškozené sítnici zvýšené hladiny IL-1 α , IL-1 β a IL-6 oproti zdravým kontrolám. Naopak exprese genu pro rodopsin byla nižší u myši, které obdržely NaIO₃ v porovnání se zdravými jedinci. Po lokální aplikaci MSC 48 h před i.p. podáním NaIO₃ jsme zaznamenali u léčeného oka vyšší zastoupení buněk pozitivních pro rodopsin a snížení infiltrace makrofágů oproti neléčenému oku. Exprese rodopsinu byla ověřena také metodou RT-PCR. Zároveň došlo u léčeného oka k regulaci exprese genů pro IL-1 α , IL-1 β a IL-6. Tento efekt byl také ověřen i v *in vitro* systému. Sedmý den po i.p. aplikaci NaIO₃ byly explantáty sítnic odebrány a kultivovány 48 h samostatně nebo v přítomnosti MSC. Podobně, jako v *in vivo* modelu, kokultivace s MSC snížila u buněk sítnice expresi genů pro IL-1 α , IL-1 β a IL-6 a naopak zde došlo k vyšší expresi genu pro rodopsin, oproti neléčeným vzorkům.

Působení NaIO₃ na explantáty sítnic bylo testováno v *in vitro* systému. Pomocí WST-1 testu jsme určili vhodnou koncentraci chemikálie, při které došlo po 48 h u buněk sítnice ke snížení metabolické aktivity oproti kontrolním vzorkům. Při této koncentraci jsme pomocí metody RT-PCR změřili u explantátů sítnic zvýšenou expresi genů pro IL-1 α a IL-6. Zároveň došlo ke zvýšení exprese genů pro proapoptické molekuly p53 a Bax a naopak k poklesu exprese genů pro antiapoptickou molekulu Bcl-2. Tento efekt byl snížen kokultivací s MSC. Prokázali jsme, že použití supernatantu získaného kultivací stimulovaných nebo nestimulovaných MSC mělo regulační efekt na expresi genů pro IL-1 α a IL-6 v buňkách sítnice kultivovaných v přítomnosti

NaIO₃. Použití supernatantu z MSC však nevykazovalo efekt na regulaci exprese genů pro molekuly účastnící se apoptózy.

Pro studium působení cytokinů konstitutivně produkovaných MSC jsme kultivovali zadní segmenty oka společně s NaIO₃ a v přítomnosti TGF-β nebo HGF. Přítomnost HGF neměla významný vliv na expresi testovaných genů v buňkách sítnice oproti neléčeným kontrolám. TGF-β snížilo částečně expresi genu pro IL-6, u dalších měřených faktorů však ke změnám nedošlo. Parakrinní působení MSC na imunomodulaci je tak závislé na více možných faktorech.

Naše výsledky ukazují, že MSC mají protektivní účinek na degeneraci buněk sítnice a zároveň mohou regulovat imunitní odpověď v poškozeném oku. Mohly by tak být použity jako perspektivní zdroj pro buněčnou terapii degenerativních onemocnění sítnice.

9. Seznam literatury

Araújo, V. De, Carrillo-Gálvez, A. B., Martín, F., Anderson, P. (2018). TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 43, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.06.002>

Atmaca-sonmez, P., Li, Y., Yamauchi, Y., Schanie, C. L. (2006). Systemically transferred hematopoietic stem cells home to the subretinal space and express RPE-65 in a mouse model of retinal pigment epithelium damage. *Experimental Eye Research*, 83 (5), 1295–1302. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.07.013>

Balmer, J., Zulliger, R., Roberti, S., Enzmann, V. (2015). Retinal cell death caused by sodium iodate involves multiple caspase-dependent and caspase-independent cell-death pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (7), 15086–15103. <https://doi.org/10.3390/ijms160715086>

Barzelay, A., Algor, S. W., Niztan, A., Katz, S., Benhamou, M., Nakdimon, I., Azmon, N., Gozlan, S., Mezaad-Koursh, D., Neudorfer, M., Goldstein, M., Meilik, B., Loewenstein, A., Barak, A. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem cells migrate and rescue RPE in the setting of oxidative stress. *Stem Cells International*, 13. <https://doi.org/10.1155/2018/9682856>

Berkowitz, B. A., Bredell, B. X., Davis, C., Samardzija, M., Grimm, C., Roberts, R. (2015). Measuring in vivo free radical production by the outer retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56 (13), 7931–7938. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18420>

Bhutto, I. A., Ogura, S., Baldeosingh, R., Mcleod, D. S., Lutty, G. A., Edwards, M. M. (2018). An acute injury model for the phenotypic characteristics of geographic atrophy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59 (4), 143–151. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24245>

Broekman, W., Amatngalim, G. D., Mooij-eijk, Y. De, Oostendorp, J., Roelofs, H., Taube, C., Stolk, J., Hiemstra, P. S. (2016). TNF- α and IL-1 β -activated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth factor receptor. *Respiratory Research*, 17 (3), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0316-1>

Caceres, P. S., and Rodriguez-Boulan, E. (2019). Retinal pigment epithelium polarity in health and blinding diseases. *Current Opinion in Cell Biology*, 62, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.08.001>

Castanheira, P., Torquetti, L., Nehemy, M. B., Goes, A. M. (2008). Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 71 (5), 644–650. <https://doi.org/10.1590/S0004-27492008000500007>

Çerman, E., Akkoç, T., Eraslan, M., Özlem, Ş., Özkara, S. (2016). Retinal electrophysiological effects of intravitreal bone marrow derived mesenchymal stem cells in streptozotocin induced diabetic rats. *PLoS One*, 11 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156495>

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G., L., Pistoia, V., Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107 (1), 367–373. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>.

Ding, S. L. S., Koh, A. E. H., Kumar, S., Ali Khan, M. S., Alzahrani, B., Mok, P. L. (2019). Genetically-modified human mesenchymal stem cells to express erythropoietin enhances differentiation into retinal photoreceptors: An in-vitro study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 195, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.04.008>

Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D., J., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Elshaer, S. L., Evans, W., Pentecost, M., Lenin, R., Periasamy, R., Jha, K. A., Alli, S., Gentry, J., Thomas, S., M., Sohl, N., Gangaraju, R. (2018). Adipose stem cells and their paracrine factors are therapeutic for early retinal complications of diabetes in the Ins2Akita mouse. *Stem Cell Research and Therapy*, 9 (1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1059-y>

Emre, E., Yüksel, N., Duruksu, G., Pirhan, D., Subaşı, C., Erman, G., Karaöz, E. (2015). Neuroprotective effects of intravitreally transplanted adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an experimental ocular hypertension model. *Cytotherapy*, 17 (5), 543–559. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.12.005>

Ezquer, M., Urzua, C. A., Montecino, S., Leal, K., Conget, P., Ezquer, F. (2016). Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 7 (42), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0299-y>

Fisichella, V., Giurdanella, G., Platania, C. B. M., Romano, G. C., Leggio, G., M., Salomone, S., Drago F., Caraci, F., Bucolo C. (2016). TGF- β 1 prevents rat retinal insult induced by amyloid- β (1–42) oligomers. *European Journal of Pharmacology*, 787, 72–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.002>

Fitzsimmons, R. E. B., Mazurek, M. S., Soos, A., Simmons, C. A. (2018). Mesenchymal stromal / stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>

François, M., Romieu-mourez, R., Li, M., Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular Therapy*, 20 (1), 187–195. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.189>

Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. F., Tse, H. F., Fu, Q. I., Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death and Diseases*, 7 (1). <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>

Giuliani, M., Bennaceur-Griscelli, A., Nanbakhsh, A., Oudrhiri, N., Chouaib, S., Azzarone, B., Durrbach, A., Lataillade, J.-J. (2014). TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cells*, 32 (1), 290–300. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1563>

Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W. F., Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105 (7), 2821–2827. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>

Gong, L., Wu, Q., Song, B., Lu, B., Zhang, Y. (2008). Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 36 (7), 666–671. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2008.01857.x>

Hanus, J., Anderson, C., Sarraf, D., Ma, J., Wang, S. (2016). Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate. *Cell Death Discovery*, 2, 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.54>

Harper, M. M., Grozdanic, S. D., Blits, B., Kuehn, M. H., Zamzow, D., Buss, J. E., Kardon, R. H., Sakaguchi, D. S. (2011). Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52 (7), 4506–4515. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7346>

Heng, L. Z., Comyn, O., Peto, T., Tadros, C., Ng, E., Sivaprasad, S., Hykin, P. G. (2013). Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabetic Medicine*, 30 (6), 640–650. <https://doi.org/10.1111/dme.12089>

Heo, J. H., Yoon, J. A., Ahn, E. K., Kim, H., Urm, S. H., Oak, C. O., Yu, B. Ch., Lee, S. J. (2018). Intraperitoneal administration of adipose tissue-derived stem cells for the rescue of retinal degeneration in a mouse model via indigenous CNTF up-regulation by IL-6. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (3), 1370–1382. <https://doi.org/10.1002/term.2522>

Hermankova, B., Kossli, J., Bohacova, P., Javorkova, E., Hajkova, M., Krulova, M., Zajicova, A., Holan, V. (2019). The immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells in a retinal inflammatory environment. *Stem Cell Reviews and Reports*. 15 (6) <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09908-0>

Hermankova, B., Kossl, J., Javorkova, E., Bohacova, P., Hajkova, M., Zajicova, A., Holan, V. (2017). The identification of interferon- γ as a key supportive factor for retinal differentiation of murine mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 26 (19), 1399–1408. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0111>

Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., Wong, R. O. L. (2014). Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 42, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003>

Huaman, O., Bahamonde, J., Cahuascanco, B., Jarvis, M., Palomino, J. (2019). Immunomodulatory and immunogenic properties of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow and adipose tissue. *Research in Veterinary Science*, 124, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.03.017>

Chen, H., Zhang, X., Liao, N., Wen, F. (2016). Increased levels of IL-6, sIL-6R, and sgp130 in the aqueous humor and serum of patients with diabetic retinopathy. *Molecular Vision*, 22, 1005–1014.

Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A. (2011). Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (42), 17384–17389. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103650108

Chowers, G., Cohen, M., Marks-ohana, D., Stika, S., Eijzenberg, A., Banin, E. (2017). Course of sodium iodate – induced retinal degeneration in albino and pigmented mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58 (4), 2239–2250. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-21255>

Inzur, L. P. and Fir, R. O. (2015). Mesenchymal stromal cells prevent allostimulation in vivo and control checkpoints of Th1 priming: migration of human DC to lymph nodes and NK cell activation. *Stem Cells*, 33 (10), 3087–3099. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.2104>

Jiang, W. and Xu, J. (2019). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 53 (1). <https://doi.org/10.1111/cpr.12712>

Jiang, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Wang, M., Zhang, X. (2014). Therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells on laser-induced retinal injury in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (6), 9372–9385. <https://doi.org/10.3390/ijms15069372>

Jin, W., Xing, Y., Yang, A. (2009). Epidermal growth factor promotes the differentiation of stem cells derived from human umbilical cord blood into neuron-like cells via taurine induction in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 45 (7), 321–327. <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9184-7>

Juel, H. B., Faber, C., Svendsen, S. G., Vallejo, A. N., Nissen, M. H. (2013). Inflammatory cytokines protect retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death. *PLoS One*, 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064619>

Kanji, S. and Das, H. (2017). Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2017/5217967>

Kicic, A., Shen, W. Y., Wilson, A. S., Constable, I. J., Robertson, T., Rakoczy, P. E. (2003). Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *The Journal of Neuroscience*, 23 (21), 7742–7749. <https://doi.org/23/21/7742>

Kiuchi, K., Yoshizawa, K., Shikata, N., Moriguchi, K. (2002). Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Current Eye Research*, 25 (6), 373–379. <https://doi.org/10.1076/ceyr.25.6.373.14227>

Labrador Velandia, S., Di Lauro, S., Alonso-Alonso, M. L., Tabera Bartolomé, S., Srivastava, G. K., Pastor, J. C., Fernandez-Bueno, I. (2018). Biocompatibility of intravitreal injection of human mesenchymal stem cells in immunocompetent rabbits. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 256 (1), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00417-017-3842-3>

Lejkowska, R., Kawa, M. P., Pius-Sadowska, E., Rogińska, D., Łuczowska, K., Machaliński, B., Machalińska, A. (2019). Preclinical evaluation of long-term neuroprotective effects of BDNF-engineered mesenchymal stromal cells as intravitreal therapy for chronic retinal degeneration in Rd6 mutant mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030777>

Li, K., Liu, S., Zhong, X. F., Ge, J. (2018). Generation of an acute retinal photoreceptor degeneration model in rabbits. *American Journal of Translational Research*, 10 (1), 235–245.

Li, L., Du, G. P., Wang, D. J., Zhou, J., Jiang, G., Jiang, H. (2017). Overexpression of heme oxygenase-1 in mesenchymal stem cells augments their protection on retinal cells in vitro and attenuates retinal ischemia/reperfusion injury in vivo against oxidative stress. *Stem Cells International*, <https://doi.org/10.1155/2017/4985323>

Li, M., Xie, Z., Cai, Z., Su, F., Zheng, G., Li, J., Wang, S., Cen, S., Liu, W., Tang, S., Ye, G., Li, Z., Mi, R., Pan, Y., Wang, P., Wu, Y. (2019). lncRNA-mRNA expression profiles and functional networks of mesenchymal stromal cells involved in monocyte regulation. *Stem Cell Research and Therapy*, 10 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1306-x>

Li, Y., Atmaca-sonmez, P., Schanie, C. L., Ildstad, S. T., Kaplan, H. J., Enzmann, V. (2007). Endogenous bone marrow-derived cells express retinal pigment epithelium cell markers and migrate to focal areas of RPE damage. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48 (9), 4321–4327. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1015>

Lu, D., Ma, T., Zhou, X., Jiang, Y., Han, Y. (2019). B lymphocytes are the target of mesenchymal stem cells immunoregulatory effect in a murine Graft-versus-Host disease model. *Cell Transplantation*, 28 (9-10), 1279–1288. <https://doi.org/10.1177/0963689719860127>

Ludwig, P. E., Freeman, S. C., Janot, A. C. (2019). Novel stem cell and gene therapy in diabetic retinopathy, age related macular degeneration, and retinitis pigmentosa. *International Journal of Retina and Vitreous*, 5 (7), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40942-019-0158-y>

Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-alegría, J., Contreras, R., Nova-lamperti, E., Tejedor, G., Noël, D., Jorgensen, Ch., Figueroa, F., Djouad, F. (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 4 (3), <https://doi.org/10.1186/scrt216>

Mahla, R. S. (2016). Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2016/6940283>

Machalińska, A., Kawa, M., Pius-Sadowska, E., Stępniewski, J., Nowak, W., Rogińska, D., Kaczyńska, K., Baumert, B., Wiszniewska, B., Józkowicz, A., Dulak, J., Machaliński, B. (2013). Long-term neuroprotective effects of NT-4-engineered mesenchymal stem cells injected intravitreally in a mouse model of acute retinal injury. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54 (13), 8292–8305. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12221>

Mallmann, F. and Canani, L. H. (2018). Intravitreal neurodegenerative and inflammatory mediators in proliferative diabetic retinopathy. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 82 (4), 275–282. <http://dx.doi.org/10.5935/0004-2749.20190055>

Mao, X., Pan, T., Shen, H., Xi, H., Yuan, S., Liu, Q. (2018). The rescue effect of mesenchymal stem cell on sodium iodate-induced retinal pigment epithelial cell death through deactivation of NF- κ B-mediated NLRP3 inflammasome. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.038>

Mendel, T. A., Clabough, E. B. D., Kao, D. S., Demidova-Rice, T. N., Durham, J. T., Zotter, B. C., Seaman, S. A., Cronk, S. M., Rakoczy, E. P., Katz, A. J., Herman, I.M., Peirce, S. M., Yates, P. A. (2013). Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy. *PLoS One*, 8 (5), 1-11 <https://doi:10.1371/journal.pone.0065691>

Mesquida, M., Drawnel, F., Fauser, S. (2019). The role of inflammation in diabetic eye disease. *Seminars in Immunopathology*, 41 (4), 427–445. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00750-7>

Millán-Rivero, J. E., Nadal-Nicolás, F. M., García-Bernal, D., Sobrado-Calvo, P., Blanquer, M., Moraleda, J. M., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M. (2018). Human Wharton's jelly

mesenchymal stem cells protect axotomized rat retinal ganglion cells via secretion of anti-inflammatory and neurotrophic factors. *Scientific Reports*, 8 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34527-z>

Moriguchi, M., Nakamura, S., Inoue, Y., Nishinaka, A., Nakamura, M., Hara, H. (2018). Irreversible photoreceptors and RPE cells damage by intravenous sodium iodate in mice is related to macrophage accumulation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59 (8), 3476–3487. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23532>

Moviglia, G. A., Blasetti, N., Zarate, J. O., Pelayes, D. E. (2012). In vitro differentiation of adult adipose mesenchymal stem cells into retinal progenitor cells. *Ophthalmic Research*, 48. <https://doi.org/10.1159/000339839>

Nassar, K., Grisanti, S., Elfar, E. (2014). Serum cytokines as biomarkers for age-related macular degeneration. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253 (5), 699–704. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2738-8>

Ng, T. K., Fortino, V. R., Pelaez, D., Cheung, H. S., (2014). Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World Journal of Diabetes*, 6 (2), 111–119. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.111>

Niwa, M., Aoki, H., Hirata, A., Tomita, H., Green, P. G., Hara, A. (2016). Retinal cell degeneration in animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms17010110>

Ohtaka, K., Machida, S., T., Tanaka, M., Kurosaka, D., Masuda, T., Ishii, T. (2006) Protective effect of hepatocyte growth factor against degeneration of the retinal pigment epithelium and photoreceptor in sodium iodate-injected rats. *Current Eye Research*, 31 (4), 347-355. <https://doi.org/10.1080/02713680600629797>

Rajashekhar, G., Ramadan, A., Abburi, C., Callaghan, B., Traktuev, D. O., Evans-Molina, C., Maturi, R., Harris, A., Kern, T. S. March, K. L. (2014). Regenerative therapeutic potential of

adipose stromal cells in early stage diabetic retinopathy. *PLoS ONE*, 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084671>

Romieu-Mourez, R., François, M., Boivin, M.-N., Bouchentouf, M., Spaner, D. E., Galipeau, J. (2009). Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *The Journal of Immunology*, 182 (12), 7963–7973. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803864>

Saldaña, L., Bensiamar, F., Vallés, G., Mancebo, F. J., García-rey, E., Vilaboa, N. (2019). Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors. *Stem Cell Research and Therapy*, 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1156-6>

Schultz, H., Song, Y., Baumann, B. H., Kapphahn, R. J., Montezuma, S. R., Ferrington, D. A., Dunaief, J. L. (2019). Increased serum proteins in non-exudative AMD retinas. *Experimental Eye Research*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.026>

Sohni, A., and Verfaillie, C. M. (2013). Mesenchymal stem cells migration, homing and tracking. *Stem Cells International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/130763>

Su, V. Y., Lin, C., Hung, S. (2019). Mesenchymal stem cell-conditioned medium induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ B pathway in endotoxin-induced acute lung injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (9). <http://doi:10.3390/ijms20092208>

Sundar, J. C., Munezero, D., Bryan-haring, C., Saravanan, T., Jacques, A., Ramamurthy, V. (2020). Rhodopsin signaling mediates light-induced photoreceptor cell death in rd10 mice through a transducin-independent mechanism. *Human Molecular Genetics*, 29 (3), 394-406. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz299>

Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P., Holan, V. (2012). The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-

inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells and Development*, 21 (6), 901–910. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0157>

Tomchucka, S. L., Zvezdaryka, K. J., Coffelta S. B., Watermanb, R. S., Dankaa, E. S, Scandurroa A. B., (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cell*, 26 (1). <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Vilela, C. A. P., Souza, L. E. B., Siqueira, R. C., Calado, R. T., Covas, D. T., Paula, J. S. (2018). Ex vivo evaluation of intravitreal mesenchymal stromal cell viability using bioluminescence imaging. *Stem Cell Research and Therapy*, 9 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0909-y>

Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 5 (4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>

Weinreb, R. N., Aung, T., Medeiros, F. A., (2015). The pathophysiology and treatment of glaucoma: A Review. *JAMA Ophthalmology*, 311 (18), 1901–1911. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3192>.

Weiss, J. N., Levy, S., (2018) Stem Cell Ophthalmology Treatment Study: bone marrow derived stem cells in the treatment of Retinitis Pigmentosa. *Stem Cell Investigation*, 5 (18). <http://dx.doi.org/10.21037/sci.2018.04.02>

Wilkinson-berka, J. L., Allingham, M. J., Suphapimol, V., Jerome, J. R., Deliyanti, D. (2019). Angiotensin II and aldosterone in retinal vasculopathy and inflammation. *Experimental Eye Research*, 187. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107766>

Wooff, Y., Man, S. M., Aggio-bruce, R., Natoli, R., Fernando, N. (2019). IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01618>

Zanto, T. P., Hennigan, K., Östberg, M., Clapp, W. C., Gazzaley, A. (2013). Roles of Wnt/ β -catenin signaling in retinal neuron-like differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from nonobese diabetic mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 49 (2), 250–261. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.08.003>.

Zhou, Y., Day, A., Haykal, S., Keating, A., Waddell, T. K. (2013). Mesenchymal stromal cells augment CD4+and CD8+ T-cell proliferation through a CCL2 pathway. *Journal of Cytotherapy*, 15 (10), 1195–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.009>

Zomer, H. D., Vidane, A. Z., Goncalves, N. N., Ambrósio, C. E. (2015). Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 28 (8), 125–134. <http://dx.doi.org/10.2147/SCCAA.S88036>