

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Imunologie



Bc. Natálie Jaborová

Mitochondriální transfer z mezenchymálních kmenových buněk do
makrofágů

Mitochondrial Transfer from Mesenchymal Stem Cells to Macrophages

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování

Poděkování patří především mé vedoucí práce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. a konzultantce Mgr. Veronice Somové za odborné rady a vřelý přístup ve všech směrech. Také bych ráda poděkovala mé rodině, příteli a přátelům za neutuchající podporu při vypracovávání této práce. Moc děkuji také celému kolektivu Laboratoře Imunoregulací, jejíž členové mi byli po celou dobu mého studia velkou oporou.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a veškerou literaturu spolu s ostatními informačními zdroji řádně ocitovala. Tato závěrečná práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 4. 2025

Podpis: Natálie Jaborová

Abstrakt

Mitochondriální transfer je jedním z mnoha mechanismů, kterým mezenchymální kmenové buňky modulují své okolí. Mnoha studiemi bylo potvrzeno, že je prostředkem pro regulaci imunitního systému, kdy působí především protizánětlivě. Mitochondriální transfer z mezenchymálních kmenových buněk do makrofágů byl charakterizován *in vitro* i *in vivo* systémech a bývá typicky spojován s podporou polarizace do protizánětlivých M2 fenotypů. Fenomén mitochondriálního transferu je nedostatečně prozkoumán, a to především z hlediska faktorů, které ho iniciují a regulují. Tato diplomová práce si kladla za cíl blíže popsat přenos mitochondrií z mezenchymálních kmenových buněk do makrofágů *in vitro* i *in vivo* podmínkách. Byl analyzován mitochondriální transfer do tkáňových makrofágů a dále do polarizovaných makrofágů diferencovaných z monocytů kostní dřeně. Pro větší biologickou relevanci byl přenos mitochondrií sledován také *in vivo* transgenním myším modelem *mito::mKate2*. Vedle samotného mitochondriálního transferu byla měřena produkce reaktivních kyslíkových radikálů, jakožto možných regulačních molekul tohoto procesu. Získaná data ukazují signifikantní rozdíly v přenosu mitochondrií mezi makrofágy izolovanými z různých tkání. U tkáňových makrofágů byla poté měřena i produkce reaktivních kyslíkových radikálů a relativní exprese genů souvisejících s antioxidační kapacitou. Nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v přenosu mezi jednotlivými typy polarizovaných makrofágů. V *in vivo* modelu byly detekovány významné rozdíly v míře přenosu mitochondrií i úrovni infiltrace mezenchymálních kmenových buněk mezi jednotlivými tkáněmi. Zavedená hypotéza souvislosti reaktivních kyslíkových radikálů a mitochondriálního transferu se nepotvrdila v plné míře. Práce přinesla nové, doposud v literatuře nepopsané, poznatky, které mohou sloužit jako základ pro další studie tohoto fenoménu.

Klíčová slova: mitochondrie, mitochondriální transfer, mezenchymální kmenové buňky, makrofágy, polarizace makrofágů, reaktivní kyslíkové radikály

Abstract

Mitochondrial transfer is one of many mechanisms by which mesenchymal stem cells modulate their environment. It has been confirmed by many studies to be a means of regulating the immune system, where it is primarily anti-inflammatory. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to macrophages has been characterized in both *in vitro* and *in vivo* systems and is typically associated with promoting polarization into anti-inflammatory M2 phenotypes. The phenomenon of mitochondrial transfer is poorly understood, particularly in terms of the factors that initiate and regulate it. This thesis aimed to further describe mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to macrophages under *in vitro* and *in vivo* conditions. Mitochondrial transfer to tissue macrophages and further to polarized macrophages differentiated from bone marrow monocytes was analyzed. For greater biological relevance, mitochondrial transfer was also monitored in an *in vivo* transgenic mouse model, *mito::mKate2*. In addition to mitochondrial transfer itself, the production of reactive oxygen species as possible regulatory molecules of this process was measured. The data obtained show significant differences in mitochondrial transfer between macrophages isolated from different tissues. The production of reactive oxygen species and the relative expression of genes related to antioxidant capacity were then measured in tissue macrophages. No significant differences in transmission were observed between the different types of polarized macrophages. In the *in vivo* model, significant differences in the mitochondrial transfer rate and the level of mesenchymal stem cell infiltration were detected between different tissues. The established hypothesis of a link between reactive oxygen species and mitochondrial transfer was not fully confirmed. The work has provided new findings, not described in the literature so far, which may serve as a basis for further studies of this phenomenon.

Keywords: mitochondria, mitochondrial transfer, mesenchymal stem cells, macrophages, macrophage polarization, reactive oxygen species

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	
1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	3
2.1 Mezenchymální kmenové buňky	3
2.1.1 Imunomodulační vlastnosti MSC.....	4
2.1.2 Terapeutický potenciál MSC a jeho limitace	6
2.2 Makrofágy	7
2.2.1 Tkáňové rezidentní makrofágy	8
2.2.2 Polarizace makrofágů a koncept fenotypů	10
2.3 Mitochondriální transfer	15
2.3.1 Mitochondriální transfer jako heterogenní proces	15
2.3.2 Mechanismy sloužící k přenosu mitochondrií	16
2.3.3 Faktory indukující a regulující mitochondriální transfer	19
2.3.4 Imunoregulační vlastnosti MSC zprostředkované mitochondriálním transferem	20
3. Cíle diplomové práce.....	22
4. Materiály a metody	23
4.1 Zvířata	23
4.2 Média a roztoky	23
4.2.1 Média.....	23
4.2.2 Roztoky	23
4.3 Technické vybavení	24
4.4 Software	25
4.5 Izolace imunitních buněk z orgánů.....	25
4.6 Izolace kostní dřeně a její zamražení.....	26
4.7 Izolace mesenchymálních kmenových buněk.....	26
4.8 Diferenciace makrofágů z BM a polarizace makrofágů	26
4.9 Barvení mitochondrií	27
4.10 Kokultivační <i>in vitro</i> experimenty.....	28
4.11 Průtoková cytometrie	28
4.11.1 Fluorescenční značení polarizovaných makrofágů ve společné kultivaci	29
4.11.2 Detekce reaktivních forem kyslíku průtokovou cytometrií	30

4.12	Inhibice produkce ROS a NO makrofágy	31
4.13	Stanovení mitochondriálního transferu v <i>in vivo</i> modelu	32
4.13.1	Příprava vzorků jater na kryorezy	32
4.14	Restimulace	33
4.15	Fluorescenčně aktivovaná buněčná separace (sort)	33
4.16	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce.....	33
4.16.1	Izolace RNA.....	33
4.16.2	Reverzní transkripce.....	34
4.16.3	Určení relativní exprese genu metodou qPCR	35
4.17	Griessova reakce	35
4.18	Fluorescenční mikroskopie	36
4.18.1	Fluorescenční mikroskopie <i>in vitro</i> kokultivace	36
4.18.2	Fluorescenční mikroskopie jaterních řezů	36
4.19	Statistická analýza	37
5.	Výsledky	38
5.1	Mitochondriální transfer do tkáňových makrofágů (<i>in vitro</i>)	38
5.1.1	Produkce reaktivních kyslíkových radikálů tkáňovými makrofágy.....	38
5.1.2	Antioxidační kapacita tkáňových makrofágů.....	41
5.2	Mitochondriální transfer do polarizovaných makrofágů (<i>in vitro</i>).....	42
5.2.1	Diferenciace makrofágů z kostní dřeně.....	42
5.2.2	Fenotypizace polarizovaných makrofágů	42
5.2.3	Produkce NO polarizovanými makrofágy	45
5.2.4	Mitochondriální transfer do polarizovaných makrofágů.....	45
5.2.5	Produkce reaktivních kyslíkových radikálů polarizovanými makrofágy.....	47
5.2.6	Mitochondriální transfer do různě polarizovaných makrofágů ve společné kultivaci	47
5.2.7	Produkce reaktivních kyslíkových radikálů různě polarizovanými makrofágy ve společné kultivaci	48
5.2.8	Inhibice produkce ROS a NO makrofágy	49
5.3	Mitochondriální transfer v <i>in vivo</i> modelu.....	51
5.3.1	Infiltrace makrofágů.....	51
5.3.2	Mitochondriální transfer v <i>in vivo</i> modelu	52
5.3.3	Infiltrace MSC do tkání souvisejících s peritoneální dutinou	54
5.3.4	Expres vybraných znaků makrofágy v <i>in vivo</i> modelu	54
6.	Diskuse.....	56
7.	Závěr.....	66

8.	Seznam použité literatury.....	67
-----------	---------------------------------------	-----------

Seznam použitých zkratk

Arg1	argináza-1 (arginase-1)
ASC	mezenchymální kmenové buňky pocházející z tukové tkáně (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BM	kostní dřeň (bone marrow)
BM-MSC	mezenchymální kmenové buňky pocházející z kostní dřeně (bone marrow-derived mesenchymal stem cells)
BMdM	makrofágy odvozené z kostní dřeně (bone marrow-derived macrophages)
CD	diferenciační skupina (cluster of differentiation)
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
Cx	konexin (connexin)
DAMP	molekulární vzor asociovaný s poškozením (damage-associated molecular pattern)
DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
EV	extracelulární vezikuly (extracellular vesicles)
FACS	fluorescenčně aktivovaná buněčná separace (fluorescent-activated cell sorting)
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
FC	průtoková cytometrie (flow cytometry)
FMO	fluorescence minus one
GJC	volné spoje (gap junctions)
GM-CSF	faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

HIF-1α	hypoxií indukovatelný faktor 1 alfa (hypoxia-inducible factor 1 alpha)
IFN-γ	interferon gamma (interferon gamma)
IL	interleukin (interleukin)
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
LPM	velké peritoneální makrofágy (large peritoneal macrophages)
LPS	lipopolysacharid (lipopolysaccharide)
M-CSF	faktor stimulující růst kolonií makrofágů (macrophage colony-stimulating factor)
mAb	monoklonální protilátka (monoclonal antibody)
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MitoT/MitoTDR	MitoTracker Red CMXRos/MitoTracker Deep Red FM
Mitotransfer	mitochondriální transfer
MSC	mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
NAC	N-acetylcystein
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)
OxPhos	oxidativní fosforylace (oxidative phosphorylation)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffer solution)
pWAT	peritoneální bílá tuková tkáň (peritoneal white adipose tissue)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time polymerase chain reaction)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RPM	makrofágy červené pulpy (red pulp macrophages)
RPMI	Roswell Memorial Park Institute 1640 medium
TGF-β	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)

TLR	Toll-like receptory (Toll-like receptors)
TNF-α	faktor nekrotizující nádory alfa (tumor necrosis factor alpha)
TNT	tunelové nanotrubičky (tunneling nanotubes)
TRM	tkáňové rezidentní makrofágy (tissue-resident macrophages)

1. Úvod

Mitochondrie jsou multifunkční dynamické organely, které výrazně překračují hranice jejich označení jako „buněčných elektráren“. Evolučně byly mitochondrie eukaryotickou buňkou získány endosymbiotickou událostí, kdy se pohlčená proteobakterie postupně stala semiautonomní organelou, mitochondrií (Sagan, 1967). Mitochondrie plní v buňce široké spektrum funkcí, které sahají od metabolismu až po regulaci buněčné smrti. Nejvýraznější funkcí mitochondrií je oxidativní fosforylace (oxidative phosphorylation – OxPhos). Multiproteinová OxPhos dráha je lokalizována na mitochondriální vnitřní membráně a její součástí je i elektronový transportní řetězec. Vzniklý transmembránový potenciál je základem pro mnoho mitochondriálních pochodů, jako je čerpání vápenatých iontů a homeostáza vápenatých iontů, antioxidační procesy a v neposlední řadě syntéza adenosintrifosfátu (adenosine triphosphate – ATP) na komplexu V (F_0F_1 ATP syntáza) OxPhos systému (shrnutí v: Monzel et al., 2023). Díky umístění odpráhuječních proteinů ve vnitřní mitochondriální membráně, zastávají mitochondrie i termoregulační funkci (Bertholet et al., 2022). Mitochondrie jsou také centrem signalizací, například mitochondriální protivirové signalizace (MAVS) (Seth et al., 2005) či mitochondriální/vnitřní dráhy apoptózy (shrnutí v Estaquier et al., 2012). Mitochondrie jsou velmi dynamické organely procházející neustálými morfologickými i funkčními proměnami v rámci procesů fúze a štěpení. Díky tomu, že mitochondrie nejsou statické, mohou být přesouvány v rámci buňky dle momentálních energetických potřeb. Nejen výše zmíněné mitochondriální funkce a skutečnost, že jsou mitochondrie dynamické, dělají z těchto organel nepostradatelnou součást buňky, a tím pádem i atraktivní cíl pro přenos mezi buňkami. Intercelulární přenos mitochondrií označujeme jako mitochondriální transfer (zkráceně mitotransfer). V tomto procesu jsou mitochondrie horizontálně předávány mezi dvěma či více, typicky geneticky nepříbuznými, buňkami (shrnutí v: Borchering & Brestoff, 2023).

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells – MSC) využívají řadu mechanismů, kterými zprostředkovávají své regenerační a imunomodulační účinky. Jedním z těchto mechanismů je i mitotransfer, prostřednictvím kterého jsou MSC schopny předávat své mitochondrie do různorodých buněčných typů, včetně imunitních buněk. Využití MSC a mitotransferu se jeví jako slibné na poli terapií, ač se stále setkáváme s překážkami, které jejich klinickému využití brání. Další výzkum je tedy více než nutný.

Makrofágy jsou heterogenní skupinou buněk přirozené imunity, které se nachází ve všech tkáních. Mají rozličné původy, fenotypy i funkce. Mitotransfer z MSC do makrofágů byl pozorován jak *in vitro*, tak *in vivo*. Doposud ale nebylo dostatečně popsáno, jak se jeho míra liší mezi makrofágy v odlišných tkáních nebo mezi různě polarizovanými makrofágy a jaké faktory

za tím stojí. Také není jasné, jaké důsledky má přijetí mitochondrií pro makrofágy. Výzkum v oblasti mitotransferu, jako formy mezibuněčné komunikace mezi MSC a makrofágy, může napomoci pochopit mechanismy tohoto procesu do takové úrovně, která by umožnila jeho aplikaci v klinické praxi.

2. Literární přehled

2.1 Mezenchymální kmenové buňky

MSC jsou multipotentní buňky nehematopoetického původu se schopností sebeobnovy, které byly poprvé popsány již v roce 1966 (Friedenstein et al., 1966). Jejich název jim byl přiřazen ale až o dvacet pět let později (shrnutο v: Caplan, 1991). Od té doby ve vědecké komunitě aktivně probíhá diskuse ohledně ustanoveného názvu, který tak úplně nedefinuje pravý charakter těchto buněk. Těmto buňkám byl, mimo jiné, přiřazen termín „medicinální signální buňky“, který zohledňuje jejich sekretorní vlastnosti a využití v klinické praxi (shrnutο v: Caplan, 2010). MSC mají nejspíše svůj původ v perivaskulárních buňkách (resp. pericytech) (shrnutο v: Crisan et al., 2008). Ač je nomenklatura těchto buněk komplikovaná, MSC lze definovat na základě obecně uznávaných kritérií, která byla vydána Mezinárodní společností pro buněčnou terapii (ISCT) v roce 2006. Mezi ně náleží: přilnavost k plastu, schopnost multipotentní diferenciaci a exprese specifických povrchových antigenů. MSC dávají, ve standardních *in vitro* podmínkách, vzniku osteoblastů, adipocytů a chondroblastů. Zmíněné povrchové znaky zahrnují CD105 (cluster of differentiation – CD), CD73 a CD90. MSC jsou naopak typicky negativní na CD45, CD34, CD79α nebo CD19, CD14 či CD11b a neexprimují taktéž MHC II. třídy (major histocompatibility complex – MHC) (Dominici et al., 2006). Kromě povrchových charakteristik byly později identifikovány transkripční faktory exprimované MSC: OCT-4 (octamer-binding transcription factor 4) a NANOG (Sabapathy et al., 2012). Doposud ale nebyl objeven marker, který by byl specifický pouze pro MSC (shrnutο v: Soliman et al., 2021).

Zdrojem MSC je celá řada tkání, např. tkáň tuková, periferní krev a kostní dřev (tzv. MSC odvozené z dospělých tkání). Významným zdrojem jsou také neonatální tkáně jako placenta, pupeční šnůra či amniotická tekutina (tzv. MSC odvozené z neonatálních tkání) (shrnutο v: Rodríguez-Fuentes et al., 2021). Důležité je podotknout, že zdrojová tkáň značně ovlivňuje výslednou povahu konkrétní MSC z hlediska produkce cytokinů či exprese již zmíněných povrchových markerů (Petrenko et al., 2020). Jednotlivé populace a subpopulace MSC jsou tedy po imunofenotypové stránce relativně heterogenní. Tkáně se od sebe odlišují taktéž svou výtěžností a dostupností. Dobře dostupnou a v praxi využívanou tkání pro izolaci MSC, je tkáň tuková (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells – ASC) (Alió del Barrio et al., 2022).

MSC zastávají roli důležitých imunomodulačních buněk, podporují proces hojení a hematopoézy a v neposlední řadě se podílejí na udržování homeostázy. Různorodé interakce mezi MSC a jejich mikroprostředím jsou oboustranné. Mikroprostředí ovlivňuje proliferační a diferenciací kapacitu MSC. Fyziologicky se MSC nacházejí v hypoxické buněčné nise, která je mimo jiné důležitá pro nastavení míry sebeobnovy MSC a inhibici diferenciaci MSC do

efektorových buněčných typů (Xu et al., 2013). *In vitro* kultivace MSC v hypoxických podmínkách je jednou z aktuálně užívaných metodických modulací v rámci terapeutického využití MSC a bude dále diskutována na konci této podkapitoly. Uvolňované cytokiny či růstové faktory mohou podporovat, ať už autokrinně či parakrinně, diferenciaci MSC do specifických buněčných typů. Konkrétním příkladem je transformující růstový faktor β (transforming growth factor beta – TGF- β) podporující diferenciaci MSC do osteoblastů za současné inhibice adipogenní diferenciace (Du et al., 2021).

2.1.1 Imunomodulační vlastnosti MSC

Povaha mikroprostředí má vliv také na interakci MSC s imunitním systémem. MSC cílí jak na přirozenou, tak adaptivní imunitu. Schopnost imunosuprese není konstitutivně přítomná, nýbrž je zpravidla navozena specifickými podmínkami, konkrétně zánětem a kombinací zánětlivých cytokinů. MSC migrují z krve do zánětlivých tkání na základě gradientu prozánětlivých cytokinů, např. interleukinu 1 β (interleukin 1 beta – IL-1 β) a IL-6 (Szydlak et al., 2019). IL-1 β podporuje migraci MSC do místa působení skrze indukci chemokinového receptoru CXCR3 na jejich povrchu, který váže ligand CXCL9 uvolňovaný endoteliálními buňkami (Guo et al., 2018b). Na povrchu MSC se také nachází různé zastoupení Toll-like receptorů (Toll-like receptors – TLR), které reagují na přítomnost ligandů endogenní i exogenní povahy nejčastěji spojených s nebezpečím, které představuje např. zánět. Stimulace TLR vede k podpoře imunosupresivních schopností MSC (Bulati et al., 2020). Výhodou pro jejich průnik do tkání je také morfologická flexibilita a způsobilost k deformaci (Lipowsky et al., 2018). MSC jsou tedy mikroprostředím regulovány co do jejich diferenciace, migračních schopností či sekrece imunosupresivních mediátorů.

Imunomodulační potenciál je podmíněn taktéž metabolickým nastavením MSC. Schopnost MSC modulovat imunitní systém je spojena s metabolickým přepnutím na glykolýzu za současné inhibice cyklu trikarboxylových kyselin. K tomuto přepnutí dochází v zánětlivém prostředí skrze různé zánětlivé mediátory, např. interferon gamma (interferon gamma – IFN- γ) (Liu et al., 2019b).

Imunomodulační účinky MSC jsou umožněny dvěma hlavními cestami: parakrinní aktivitou nebo přímou interakcí s buňkami imunitního systému. MSC mohou podněcovat přesmyk buněk do jejich protizánětlivých fenotypů či regulovat produkci prozánětlivých a protizánětlivých molekul. Přímý i nepřímý kontakt mezi MSC a cílovou buňkou jsou využívány i v rámci mechanismů mitochondriálního transferu a budou uvedeny později.

2.1.1.1 Imunomodulace skrze parakrinní aktivitu

Tvorba extracelulárních vezikul (extracellular vesicles – EV) MSC, které směřují k buňkám imunitního systému, představuje formu nepřímé buněčné komunikace. Extracelulární

vezikuly jsou velmi heterogenní a dělí se na podtypy v závislosti na jejich velikosti a původu. Jedním z podtypů EV jsou i exozomy, malé EV s průměrem menším než 200 nm a původem v endosomálním systému. Dále lze zmínit mikrovezikuly, tedy obecně EV o větším průměru vznikající z plazmatické membrány (Welsh et al., 2024). MSC uvolňují především exozomy, jež obsahují širokou škálu molekul působících na imunitní buňky. U makrofágů vykazujících prozánětlivý fenotyp, které pohltily EV z MSC pocházejících z kostní dřeně (bone marrow-derived MSC – BM-MSC), docházelo k následné podpoře polarizace do protizánětlivého fenotypu a k potlačení zánětlivé odpovědi. Produkce prozánětlivých cytokinů klesla a protizánětlivých stoupla. To bylo potvrzeno jak *in vitro*, tak *in vivo* v modelu ulcerózní kolitidy. Injekcí EV izolovaných z MSC byly utlumeny klinické projevy tohoto onemocnění ovlivněním JAK/STAT dráhy, která se podílí na cytokinové signalizaci (Cao et al., 2019). K obdobnému navození polarizace makrofágů docházelo i po pohlcení exozomů izolovaných z gingiválních MSC (Wang et al., 2020). Exozomy mohou obsahovat mimo jiné molekuly miRNA (microRNA), které mohou stát za polarizačním potenciálem exozomů odvozených z MSC (Huang et al., 2019). Součástí exozomů mohou být ale také molekuly proteinové povahy. Proteomická analýza exozomů z ASC ukázala zastoupení vysokého množství proteinů zahrnutých v potlačení zánětu, včetně annexinu A1 (Tofiño-Vian et al., 2018).

MSC mohou parakrinně ovlivňovat i další buňky imunitního systému. Prostřednictvím exozomů zvyšují MSC zastoupení T regulačních buněk, a to přímo, ale také zprostředkovaně skrze makrofágy ovlivněné těmito exozomy, které inhibují proliferaci CD4⁺ T buněk a podporují vznik T regulačních buněk (Li et al., 2022b). Exozomy s obsahem TGF- β sekretované MSC inhibují funkci NK buněk, jelikož TGF- β potlačuje aktivaci, proliferaci a cytotoxicitu NK buněk (Fan et al., 2019).

Je nutné poznamenat, že sekretom MSC nezahrnuje pouze EV, avšak i vylučované solubilní faktory, např. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) či matrix metalloproteinázy, oba důležité v procesu regenerace (Gorgun et al., 2021).

2.1.1.2 Imunomodulace přímým buněčným kontaktem

Imunomodulace zprostředkovaná přímou mezibuněčnou interakcí je umožněna především povrchovými molekulami a jejich receptory. Samotné imunomodulaci předchází buněčná adheze mezi MSC a cílovou buňkou. Prozánětlivý cytokin IL-1 β indukuje zvýšenou expresi povrchové molekuly ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) na MSC, což vede ke zvýšené adhezi k buňkám v rámci MSC niky, a napomáhá tak efektivitě regeneračních procesů (Guo et al., 2018a). Mezibuněčný kontakt mezi MSC a prozánětlivými makrofágy byl umožněn interakcí CD200 na povrchu MSC a jeho receptoru CD200R na makrofázích. Exprese CD200 byla zvýšena po interakci MSC se zmíněnými prozánětlivými makrofágy, což ostatně dokazuje

již zmíněnou skutečnost, že imunomodulační vlastnosti MSC jsou navozeny či posíleny v závislosti na prostředí. Interakce vysoce exprimovaného CD200 s jeho receptorem měla imunosupresivní vliv na makrofágy, kdy došlo k posunu prozánětlivého k protizánětlivému fenotypu (Li et al., 2019b). Další molekuly umožňující kontaktem zprostředkovanou imunomodulaci jsou např. PD-L1 či galektin 9 a jejich receptory PD-1 a TIM-3. Při experimentální inhibici zmíněných koinhibičních molekul došlo k výraznému poklesu imunosupresivních schopností ASC vůči T buňkám, konkrétně schopnosti inhibice proliferace a produkce zánětlivého cytokinu IFN- γ T buňkami (Zhou et al., 2018).

2.1.2 Terapeutický potenciál MSC a jeho limitace

Výše popsané působení, nejen na imunitní systém, předurčuje MSC ke klinickému využití v rámci buněčných terapií. Výhodou je jejich nízká imunogenicita, která zvyšuje pravděpodobnost přijetí při allogenních transplantacích. Dále jsou dobře dostupné pro izolaci. Mezi nejčastěji využívané tkáňové zdroje se řadí kostní dřeň a tuková tkáň (shrnutí v: Jovic et al., 2022). V nedávné době byly zveřejněny neinvazivní protokoly, které popisují možnost *in vitro* produkce MSC z pluripotentních kmenových buněk, tedy např. z embryonálních kmenových buněk (Luo et al., 2020). Tím, že pro terapeutické účely je nezbytné velké množství MSC, preferovaná je po samotné izolaci ještě *in vitro* expanze (shrnutí v: Yang et al., 2022). MSC mohou být uchovávány zmražením v tekutém dusíku (tzv. kryoprezervace) (Bahsoun et al., 2023).

Většina klinických studií pracujících s MSC jako terapeutickým nástrojem je dle databáze NIH (National Library of Medicine) momentálně v I. nebo II. fázi (<https://clinicaltrials.gov>). U experimentálních prací nebo klinických studií jsou MSC podávány především intravenózně (Terada et al., 2023) nebo intraarteriálně (Chung et al., 2021). Nevýhodou těchto metod podání je zvýšené riziko okluze MSC v cévách. Vznikající trombotické stavy ale nesouvisí pouze s velikostí a adherencí těchto buněk (Masterson et al., 2021), avšak i s jejich přirozeným prokoagulačním charakterem. MSC exprimují mimo jiné tkáňový faktor (tj. faktor III), jenž je součástí koagulační kaskády (Wu et al., 2022). Z těchto důvodů je vhodné opakovaně podávat více zředěné suspenze buněk či potlačit prokoagulační reakce vyvolané MSC současným podáváním heparinu (Liao et al., 2017). Další cestou administrace MSC je intraperitoneální injekce, která je výhodná z hlediska nižšího rizika ucpání cév. Na druhou stranu, pouze malé procento MSC se dostane do systemického krevního oběhu, čímž klesá osídlení orgánů mimo peritoneální dutinu (Ai et al., 2020).

Sekretorní vlastnosti předurčují MSC také k uplatnění na poli bezbuněčných terapií. V takových případech jsou využívány pouze složky jejich sekretomu, nikoliv celé buňky. Experimentální práce jsou zaměřeny především na EV odvozené z MSC. EV mají terapeuticky

v porovnání s celými buňkami jisté výhody. Mohou překonávat imunologické bariéry, a tak působit i na méně přístupných místech, např. v mozku (Tolomeo et al., 2023). Překvapivě ani užití EV není pojistkou před vznikem trombotických stavů (Yang et al., 2024).

Dalšími komplikacemi, které brání plnohodnotnému využívání MSC v terapiích, jsou nízké posttransplantační přežívání a již zmíněná heterogenita. Řešením výše zmíněných problematik může být modulace MSC. Hlavními cestami modulace MSC jsou: *in vitro* nastavení specifických kultivačních podmínek a genetická manipulace. MSC se v těle vyskytují v mikroprostředí s určitými fyziologickými podmínkami. MSC niky jsou typicky hypoxické. Tím, že standardní *in vitro* kultivace probíhá při 21% kyslíkovém nasycení (shrnutí v: Yang et al., 2022), není dosaženo podmínek mimikujících přirozené tkáňové mikroprostředí. *In vitro* kultivace MSC v třídimenzionálních sféroidech přináší zlepšení přežívání a terapeutického potenciálu, a to právě díky mimikaci MSC niky (Chen et al., 2021). Jednou z dalších možností *in vitro* modulace MSC je stimulace různými faktory. Přidání IL-1 β do kultivačního média zvýšilo proliferační schopnost MSC, avšak na imunomodulační schopnosti MSC vliv nemělo (Bigildeev et al., 2015). Druhou zmíněnou možností modulace je aplikace metod genového inženýrství na samotné MSC. Jedná se prakticky o alternativu ke genové terapii, kdy MSC slouží jako „buněčné továrny“ produkující sekretorní komponenty se zlepšenými terapeutickými vlastnostmi. Po transfekci genu BMP2 (bone morphogenic protein 2) do BM-MSC byly produkovány exozomy se zvýšeným osteogenním potenciálem (Li et al., 2022a).

Ač je zřejmé, že MSC jsou slibným kandidátem pro budoucí klinické využití, proti stojí velké množství překážek v podobě problémů při kultivacích, přežívání či heterogenity odvíjející se od zdroje, pasáže či věku dárce (Kundrotas et al., 2016).

2.2 Makrofágy

Makrofágy jsou améboidní buňky náležící k přirozené imunitě zastávající důležitou roli v homeostáze i imunitní odpovědi. Poprvé byly tyto fagocyty pozorovány již roku 1882 ruskofrancouzským biologem Iljou Mečnikovem, který za tento objev získal v roce 1908 Nobelovu cenu (shrnutí v: Chen et al., 2023). Fagocytóza je jednou z významných efektorových funkcí makrofágů. Cíle fagocytózy mohou být buněčné debris, patogeny nebo efektorové buňky, které podlehly apoptóze v průběhu zánětu (shrnutí v: Vannella & Wynn, 2017). Z hlediska původu lze rozlišit dvě základní skupiny makrofágů: makrofágy derivované z monocytů (monocyte-derived macrophages) a tkáňové rezidentní makrofágy (tissue-resident macrophages – TRM). První uvedená skupina vzniká z cirkulujících monocytů pocházejících z prekursorů v kostní dřeni, které migrují do periferních tkání, kde se diferencují a dávají vzniku makrofágům (shrnutí v: Honold & Nahrendorf, 2018). TRM osidlují organismus již v průběhu embryonálního vývoje a jejich populace vznikají v několika vlnách hematopoézy z

progenitorů ve žloutkovém váčku nebo fetálních játrech. Tyto ustanovené populace mají následně sebeobnovující charakter a jsou víceméně nezávislé na postnatální hematopoéze (Hoeffel et al., 2015). TRM nacházíme mimo jiné v mozku (mikroglie), v bílé tukové tkáni, kostní tkáni (osteoklasty) či v játrech (Kupfferovy buňky), kde plní různorodé funkce, které budou zmíněny níže (shrnutí v: Lazarov et al., 2023).

2.2.1 Tkáňové rezidentní makrofágy

TRM lze nalézt ve všech tkáních v podobě dlouho žijících populací se schopností sebeobnovy. Určitá část obnovy může zůstat závislá na prekurzorech v kostní dřeni. Míra obnovy z těchto prekurzorů se ale liší, a to nejen dle povahy zánětu (Blériot et al., 2015), ale mimo jiné i v závislosti na pohlaví (Varghese et al., 2022). V homeostatických podmínkách nejsou populace TRM typicky obnovovány z monocytárních prekurzorů, které kolují řečištěm prokrvujícím daný orgán. Pokud ale dojde k masivnímu úbytku zde přítomných makrofágů, jejich populace mohou být plnohodnotně nahrazeny monocytárními prekurzory, které nesou stejné vlastnosti jako původní TRM (Tran et al., 2020). TRM vykazují heterogenní charakter a v rámci jednoho orgánu lze nalézt množství rozmanitých populací. Tato heterogenita vychází např. z různé přístupnosti chromatinu, a tedy z odlišné genové exprese makrofágů (Sajti et al., 2020).

Obecným markerem užívaným k charakterizaci TRM, v kombinaci s dalšími znaky, je u myši F4/80 a u lidských buněk CD11b (taktéž u myši). Je ale na místě poznamenat, že se nejedná o markery selektivní pro makrofágy, jelikož pozitivitu mohou vykazovat i další buněčné typy (shrnutí v: dos Anjos Cassado, 2017). Na heterogenitu makrofágových populací poukazuje také fakt, že je často pozorována široká škála míry exprese těchto markerů (Liu et al., 2020).

2.2.1.1 Příklady TRM a jejich funkce

TRM plní v tkáních nespočet rolí, které budou v této podkapitole nastíněny na konkrétních příkladech. Obecně se TRM účastní jak homeostatických procesů, tak těch patologických.

V játrech nalézáme majoritně Kupfferovy buňky, které lze od ostatních populací, ať už tkáňově-rezidentních, tak infiltrovaných monocytárních, odlišit dle exprese specifických markerů. Jako marker charakteristický pro myši Kupfferovy buňky je považován CLEC4F, tj. receptor Kupfferových buněk (Jiang et al., 2021). Kupfferovy buňky jsou umístěny především v periportálních oblastech jaterních lobulů. Toto imunologicky strategické umístění, které umožňuje lepší kontakt s patogeny v krvi, se nazývá imunologická zonace (immune zonation) (Gola et al., 2020). Kupfferovy buňky se podílí na časnému boji proti bakteriálním infekcím (Zhao et al., 2022). Proběhlá infekce může epigeneticky modulovat Kupfferovy buňky, např. k vyšší produkci některých cytokinů při opakovaném setkání s patogenem (Musrati et al., 2024).

Dále se podílí na regulaci metabolických dějů, např. lipogenezi (Tran et al., 2020) a odstraňování starých trombocytů, kdy při depleci Kupfferových buněk dochází k akumulaci nepotřebných trombocytů v krvi (Deppermann et al., 2020).

V imunologicky významném orgánu, slezině, nalézáme tkáňově-rezidentní populaci makrofágů červené pulpy (red pulp macrophages – RPM). RPM pohlcují senescentní a poškozené erytrocyty, přičemž dochází k recyklaci železa, a tím zpětnou smyčkou k podpoře erythropoézy. RPM se tak podílí na homeostáze železa i erytrocytů (Lévesque et al., 2021). Mezi méně známé funkce těchto makrofágů se může řadit schopnost zkřížené prezentace (cross-prezentace) antigenů. V modelu *SpiC*^{-/-} myši, kdy *SpiC* je transkripční faktor nezbytný pro vývoj a funkce RPM, byla zkřížená prezentace T lymfocytům výrazně omezena, a to hlavně v počátečních fázích imunizace (Enders et al., 2020).

Peritoneální dutina představuje imunologicky senzitivní místo, ze kterého se počáteční infekce může velmi rychle šířit do orgánů souvisejících s peritoneální dutinou. Taktéž se jedná o oblast, do které metastazuje mnoho malignit (shrnuje v: Ardavin et al., 2023). Rezidentní populaci zde představují tzv. velké peritoneální makrofágy (large peritoneal macrophages – LPM). Transkripčním faktorem určujícím fenotypovou identitu LPM, je GATA6 (Rosas et al., 2014). Lokalizace LPM umožňuje migraci do viscerálních orgánů, typicky pokud k tomu vede určitý stimul. V modelu sterilního zánětu jater byla pozorována migrace GATA6⁺ makrofágů z peritoneální dutiny. Hlavním signálem pro jejich migraci byl ATP uvolňovaný z mrtvých buněk jater, který figuroval jako molekulární vzor asociovaný s poškozením (damage-associated molecular pattern – DAMP). Přítomné LPM v játrech polarizovaly do protizánětlivého fenotypu a podporovaly regeneraci (Wang & Kubes, 2016). LPM jsou také v poslední době spojovány s chronickým zánětlivým onemocněním endometriózou, u kterého se významně podílí na patogenezi, a to konkrétně při vzniku ložisek v peritoneální dutině (Shi et al., 2021).

V tukové tkáni se nachází heterogenní subpopulace TRM, které tvoří většinu zde přítomných imunitních buněk. Ve viscerálním epididymálním bílém tuku se za fyziologických podmínek nachází makrofágy asociované s krevními cévami a adipocyty. Tyto TRM byly popsány jako „cévním systémem asociované makrofágy“, které lze dále rozdělit do dalších subpopulací dle exprese specifických markerů. V tukové tkáni plní především roli výkonných fagocytů podílejících se na udržování homeostázy. Při metabolických změnách, vycházejících z nadměrné výživy nebo naopak malnutrice, dochází k morfologickým a funkčním změnám, např. k poklesu schopnosti endocytózy (Silva et al., 2019). Častou chorobou zatěžující tukovou tkáň je obezita, přičemž na zánětlivé patogenezi tohoto onemocnění se z velké míry podílí právě makrofágy. V myším modelu obezity byl ozřejměn mechanismus, kterým vznikají tzv. pěnové

buňky (foam cells), jejichž vznik je právě spojován s obezitou. Procesem, kterým jsou likvidovány mrtvé adipocyty, je tzv. exofágie. Makrofágy vytváří v místech kontaktu s adipocyty prostředí s nízkým pH, ve kterém dochází k rozkladu adipocytů na menší fragmenty, které jsou následně pohlceny a zpracovány makrofágy. Uvolňované volné mastné kyseliny z adipocytů dále prohlubují probíhající zánět skrze podporu NF κ B prozánětlivé signalizace (Haka et al., 2016).

2.2.2 Polarizace makrofágů a koncept fenotypů

Koncept polarizace makrofágů a makrofágových fenotypů je komplikovaný. Původní pojetí, které rozdělovalo makrofágy na jakési definované fenotypové stavy, je dávno překonané a makrofágové fenotypy jsou vnímány spíše jako kontinuum, a to hlavně v komplexním *in vivo* prostředí. Makrofágy, které neprošly polarizací na základě okolního stimulu, se označují jako M0. Jedná se tedy o jakýsi výchozí neutrální stav, což je ale nutné brát s rezervou a stále brát v potaz složitost stavů, které makrofágy zaujímají (Zhang et al., 2022). V souvislosti s makrofágovou diferenciací jsou nezbytné dva faktory, a to faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – GM-CSF) a dále faktor stimulující růst kolonií makrofágů (macrophage colony-stimulating factor – M-CSF). Zmíněné cytokiny hrají roli v diferenciaci makrofágů, avšak typicky za jiných podmínek. GM-CSF podporuje nárůst makrofágových populací v rámci zánětlivé odpovědi, zatímco M-CSF je spíše faktorem udržujícím optimální množství makrofágů za homeostatických podmínek. S tím se pojí i skutečnost, že působení GM-CSF podporuje následnou polarizaci makrofágů do prozánětlivých fenotypů, kdežto M-CSF spíše do protizánětlivých (shrnuť v: Ushach & Zlotnik, 2016). Polarizací rozumíme proces, při kterém makrofág zaujímá určitý fenotyp. Na jednom pólu polarizačního spektra se nachází prozánětlivý klasicky aktivovaný M1 fenotyp, na druhém poté protizánětlivý alternativně aktivovaný M2 fenotyp. Označení těchto fenotypů odpovídá Th1/Th2 paradigmatu imunitní odpovědi (Mills et al., 2000). Mezi nimi se ale nachází řada přechodných stavů, které často nelze přesně definovat. I z tohoto důvodu se v poslední době užívá spíše formulace „phenotype-like macrophage“, tedy konkrétnímu fenotypu podobný makrofág (shrnuť v: Strizova et al., 2023). Skutečnosti fenotypové fluidity nasvědčuje i fakt, že byly pozorovány hybridy, které představují spojení několika fenotypů, např. M1M2b (Avila-Ponce de León et al., 2021). Kontext mikroprostředí a patologické stavy taktéž ovlivňují výsledný fenotyp. Transkriptomika pro- i protizánětlivě stimulovaných makrofágů odhalila variabilní spektrum aktivačních stavů makrofágů, což podporuje koncept polarizačního spektra (Xue et al., 2014). Taktéž je důležité zmínit, že TRM přirozeně zaujímají fenotypy spíše protizánětlivé, tedy M2, což souvisí s jejich převážně homeostatickými rolemi (Iwai et al., 2021; Zhou et al., 2023). Podobnou inklinaci k jednomu z fenotypů pozorujeme po zánětlivé stimulaci i u inbredních myších linií. Makrofágy C57BL/6 snáze zaujímají M1

fenotyp, což odpovídá obecnému Th1 nastavení této linie, zatímco makrofágy BALB/c nemají tak vysokou tendenci přecházet do prozánětlivých fenotypů (Watanabe et al., 2004). Co se týče signalizace související s polarizací, nezbytná je aktivace transkripčních faktorů STAT. U M1 makrofágů je to STAT1, u M2 makrofágů obecně STAT6 (shrnutí v: Juhas et al., 2015).

V této podkapitole bude představena problematika polarizace s důrazem na vybrané fenotypy, související signalizace a metabolické regulace. Pro zjednodušení budou zmíněné makrofágové stavy pojmenovávány v původním pojetí, tedy jako fenotypy.

2.2.2.1 M1 fenotyp (*M1 podobný fenotyp*)

M1 fenotyp představují makrofágy významně zapojené do zánětlivých procesů, a to především v jejich počátečních fázích. Polarizace do M1 je navozena prozánětlivou signalizací přes TLR a působením cytokinů v jejich mikroprostředí, jmenovitě IFN- γ nebo již zmíněným GM-CSF. TLR signalizaci mohou spouštět různé molekulární vzory asociované s patogeny (pathogen-associated molecular patterns – PAMP), včetně bakteriálního lipopolysacharidu (lipopolysaccharide – LPS) (shrnutí v: Strizova et al., 2023). M1 makrofágy jsou charakteristické vysokou expresí molekul souvisejících s antigenní prezentací, konkrétně MHC a CD80/86, která vede k aktivaci adaptivní složky imunity. T buňky následně podporují zánětlivou odpověď produkcí IFN- γ , který podněcuje další rozvoj makrofágových populací (shrnutí v: Guerriero, 2019). M1 makrofágy produkují širokou škálu cytokinů, typicky prozánětlivého charakteru, kupříkladu IL-1 β , IL-6 či faktor nekrotizující nádory alfa (tumor necrosis factor alpha – TNF- α). Jedním z efektorových mechanismů prozánětlivých makrofágů je produkce reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS) a také oxidu dusnatého (nitric oxide – NO) a z něj odvozených reaktivních dusíkových intermediátů (RNI) (shrnutí v: Strizova et al., 2023). Povaha M1 makrofágů je silně ovlivňována metabolickými pochody. M1 makrofágy přechází preferenčně k získávání energie z glykolýzy v porovnání s využíváním OxPhos. Toto metabolické přepnutí ke glykolýze jim přináší rychlejší, ač ne tak efektivní, zisk energie, která je nadále využívána při výše zmíněných efektorových funkcích. Signálem k přechodu ke glykolýze je právě prozánětlivý stimul, jako je působení IFN- γ na makrofágy (Wang et al., 2018). Důležitost preferenčního využívání glykolýzy dokazuje i skutečnost, že při její inhibici dochází ke snížení produkce IL-1 β makrofágy. Na glykolytickém charakteru M1 makrofágů má svůj významný podíl hypoxií indukovatelný faktor 1 alfa (hypoxia inducible factor 1 – HIF-1 α), který působí jako transkripční faktor na geny glykolytických enzymů a prozánětlivých cytokinů (Tannahill et al., 2013). Tento faktor je konkrétně součástí osy iNOS-NO-HIF-1 α , která je regulována E3 ubikvitin ligázou MDM2. MDM2 označuje k degradaci negativní inhibitor indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase – iNOS), tudíž podporuje produkci NO a aktivitu HIF-1 α (Wu et al., 2024). Nitrosylace HIF-1 α molekulou NO vede k její stabilizaci a vyšší aktivitě (Li et al., 2007). To vede k celkovému ustanovení

glykolytického a prozánětlivého charakteru M1 makrofágů. HIF-1 α , hlavní glykolytický regulátor, je tedy jasným důkazem propojení metabolismu, vzniku imunofenotypů a jejich funkčního působení.

2.2.2.2 M2 makrofágy (M2 podobný fenotyp)

M2 protizánětlivé makrofágy hrají roli především v rezoluci zánětu. Jak zánět postupuje, prozánětlivé makrofágové populace, které se podílely na odstranění patogenu, postupně polarizují na ty, které svým působením pomáhají zánět ukončit. Samozřejmě je důležité neopomenout, že M2 makrofágy mohou působit i v počátečních fázích zánětu, typicky pokud se jedná o patogeny typu helmintů, které vyvolávají Th2 imunitní odpověď (Petta et al., 2024). Dále je jejich přítomnost asociována se symptomy alergií. Procento M2 makrofágů pozitivně koreluje se závažností alergické rinitidy (Lou et al., 2023) nebo astmatu, kde byla dokonce ukázána spojitost s pravděpodobností hospitalizace dětských astmatických pacientů (Kuo et al., 2021). M2 makrofágy jsou také ty, které jsou asociovány s rakovinným mikroprostředím, ve kterém imunosupresí podporují nádorové bujení (Arlaukas et al., 2018). Hlavním úkolem protizánětlivých makrofágů je regenerace v rámci procesu hojení ran, kdy makrofágy spolupracují s řadou buněčných typů, především fibroblasty, u kterých indukují tvorbu kolagenu a jejich diferenciaci na myofibroblasty (shrnutí v: Kim & Nair, 2019). Makrofágy jsou *in vivo* schopny reagovat na okolní prostředí procházející regenerací, procesem tzv. mechanosensingu. Vnímáním mechanických vlastností, jako například tuhosti, přizpůsobují své regenerativní působení momentálnímu složení extracelulární matrix (Meizlish et al., 2024).

Mezi cytokiny, které indukují M2 fenotyp, se řadí výše zmíněný M-CSF, poté IL-4, IL-13, IL-10 a TGF- β . Dále za jejich polarizaci stojí i PAMP pocházející především z mnohobuněčných parazitů (viz helminti) či efferocytóza (fagocytóza apoptotických buněk). Tak jako je u M1 makrofágů typickým enzymatickým markerem iNOS, u M2 makrofágů je to argináza-1 (arginase-1 – Arg1). Arg1 stojí v centru močovinného cyklu, přičemž jejím substrátem je L-arginin, který je enzymaticky přeměňován na L-ornitin a močovinu (shrnutí v: Roszer, 2015). Arg1 podporuje přes tvorbu prolinu, jako jednoho z produktů L-ornitinu, tvorbu kolagenu, fibronektinu a vimentinu. Tyto molekuly jsou ukládány v regenerujících tkáních (Li et al., 2023). Zatímco M1 makrofágy preferenčně využívají k získání energie glykolýzu, M2 makrofágy přechází k OxPhos (shrnutí v: Viola et al., 2019). Při zastavení OxPhos skrze vyřazení funkce Crif1, tedy faktoru nezbytného pro tvorbu podjednotek dráhy OxPhos, dochází k podpoře polarizace do M1 fenotypů a vývoji zánětu společně s inzulinovou rezistencí v tukové tkáni (Jung et al., 2018). Mezi povrchové markery, které jsou exprimovány v různé míře mezi jednotlivými subfenotypy, se řadí CD206 a CD163, a to u myších i lidských M2 makrofágů. CD206 je receptor manózoového typu, jehož ligandy jsou molekuly glykoproteinové povahy a kolagen. Jeho imunologická role ale není stále plně objasněna (shrnutí v: Roszer,

2015). Je ale zřejmé, že jeho specifická exprese na M2 makrofázích, tedy i na těch asociovaných s nádorem, může sloužit jako prognostický marker u pacientů s nádorovým onemocněním jako je akutní myeloidní leukemie (Xu et al., 2020). M2-specifickými geny jsou nadále *Fizz1* a *Ym1*, jejichž exprese je indukována IL-4 (Raes et al., 2002). Hlavními cytokiny produkovánými M2 makrofágy jsou obecně TGF- β a IL-10 (shrnutí v: Mohmmad-Rezaei et al., 2021).

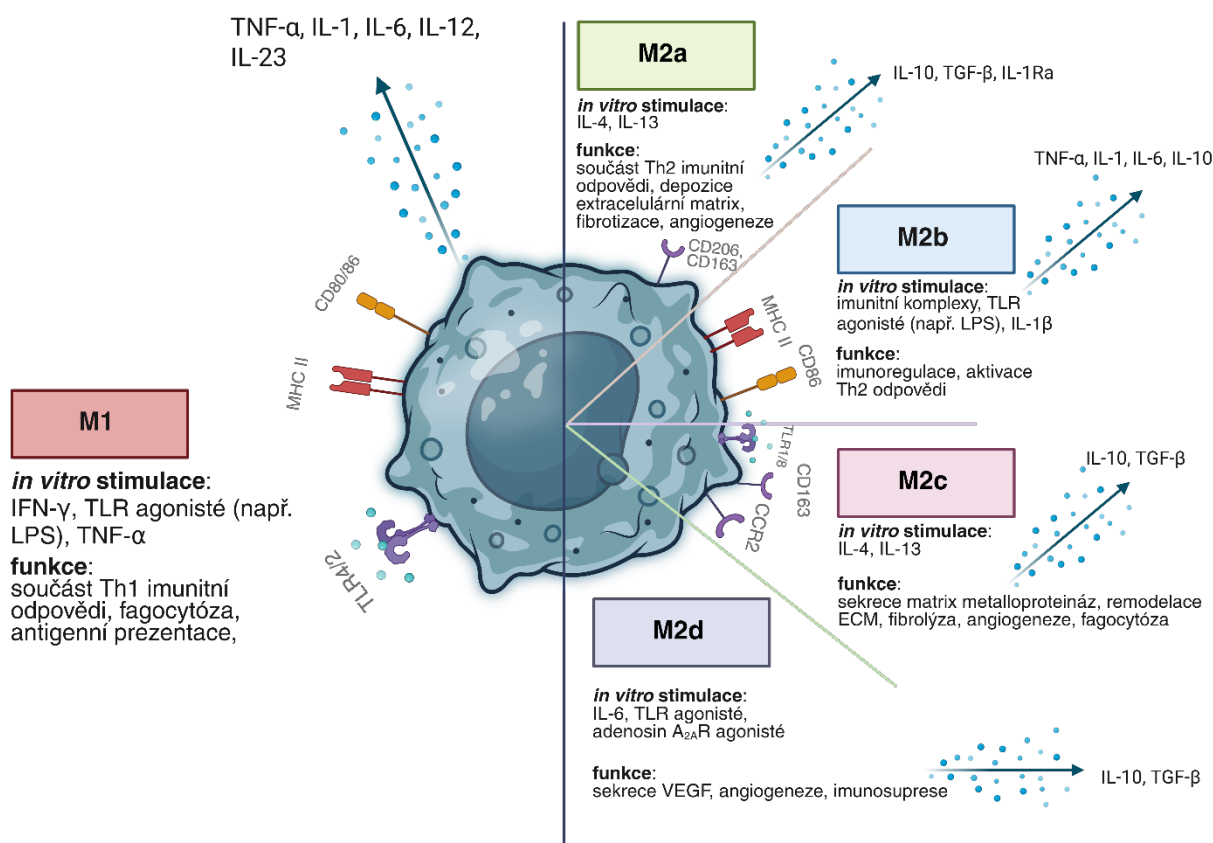
M2 makrofágy se dělí na další subfenotypy, jejichž vlastnosti dokazují různorodost funkcí protizánětlivých makrofágů. Podtypy M2 fenotypu lze rozdělit právě na základě kombinací stimulů, které ke konkrétnímu fenotypu vedou, a funkcí, které v organismu zastávají. Dále budou blíže představeny vybrané fenotypy s ohledem na ty, kterými se zabývá diplomová práce.

M2a fenotyp je navozen vlivem působení IL-4 v možné kombinaci s IL-13. Písmeno „a“ v jeho názvu vychází ze slova „alternativně“, tedy alternativně aktivovaný makrofág (shrnutí v: Roszer, 2015). M2a makrofágy vykazují regenerativní fenotyp úzce spolupracující s fibroblasty na tvorbě tzv. fibrotické jizvy. Proces fibrotizace lze pozorovat jako reakci na porušení tkáňové integrity v různých tkáních. Příkladem může být ischemická cévní mozková příhoda, kde komunikace M2a makrofágů a fibroblastů přispívá k fibrotizaci a angiogenezi regenerující tkáň mozku (Huang et al., 2024). Při nedostatečné regulaci může fibrotizace přecházet až do fibrózy, kdy je tvorba extracelulární matrix nadměrná a funkční tkáň je nahrazována vazivem, což vede k rozvoji funkčního postižení orgánu (shrnutí v: Distler et al., 2019).

Polarizace do M2c fenotypu je indukována IL-10 a glukokortikoidy (shrnutí v: Roszer, 2015). M2c fenotyp vysoce podporuje angiogenezi (Engür-Öztürk et al., 2024) a je schopen účinně regulovat proces fibrotizace a zánětu, a to lépe než M2a fenotyp (Lu et al., 2013). M2c je pozitivní na receptor tyrosin kinázy MerTK (Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase). Signalizace přes MerTK vede k uvolňování solubilních molekul do mikroprostředí. Molekuly působí na další buněčné typy, které poté zprostředkovávají různé děje, například fibrotizaci. Takovými molekulami byly např. IL-8 nebo VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) (Pastore et al., 2022). Dále je MerTK důležitá při fagocytóze. U MerTK^{-/-} alveolárních makrofágů docházelo ke snížené schopnosti pohlcování (Mohning et al., 2018). Jedná se tedy o fenotyp podílející se na regenerativních procesech, tak jako M2a makrofágy.

2.2.2.3 Další fenotypy makrofágů

Spektrální charakter makrofágové polarizace předurčuje výskyt i dalších fenotypů. Vyjma regulačního M2b a s nádory asociovaného M2d fenotypu, lze zmínit například M3 fenotyp, který je považován za jakýsi mix M1 a M2 fenotypu. M3 fenotyp byl poprvé definován jako významná populace maligního mezoteliomu (Jackaman et al., 2016). Dále Mox fenotyp představující metabolickou adaptaci makrofágů na oxidativní stres (Zhai et al., 2024). Větší *in vivo* relevanci také přináší experimentální postupy, které vystavují makrofágy současnému působení dvou zdánlivě protichůdných stimulů, LPS a IL-4. LPS/IL-4 makrofágy nejsou kompromisem mezi M1 a M2 fenotypem, nýbrž představují samostatnou unikátní populaci (Ishida et al., 2023).



Obr. č. 1: Diagram znázorňující fluiditu makrofágových fenotypů. Vlastní tvorba (vytvořeno v BioRender.com) na základě zdroje: (Martin & García, 2021). Zkratky: ECM (extracellular matrix; extracelulární matrix), VEGF (vascular endothelial growth factor; vaskulární endoteliální růstový faktor)

2.3 Mitochondriální transfer

2.3.1 Mitochondriální transfer jako heterogenní proces

Vertikální přenos mitochondrií, kdy jsou mitochondrie děděny mezi mateřskou a dceřinou buňkou, je již velmi dobře popsán (shrnutí v: Mishra & Chan, 2014). V roce 2006 byl *in vitro* poprvé objeven zcela nový fenomén horizontální přenosu mitochondrií, který byl pojmenován jako mitochondriální transfer (zkráceně mitotransfer) (Spees et al., 2006). Je ale na místě neopomenout studii publikovanou o rok dříve, která se zaměřovala na tenká propojení mezi buňkami, kterými byly mimo jiné předávány i mitochondrie. Explicitně ale v tomto článku nezaznívá termín mitochondriální transfer (Koyanagi et al., 2005). O šest let později byl mitotransfer popsán i v *in vivo* systému (Islam et al., 2012). Od té doby byl intercelulární přenos mitochondrií nebo jejich komponent, jako je genetická informace, pozorován ve velkém množství *in vitro* a *in vivo* modelů. Společně s tím byly charakterizovány i důsledky přijetí mitochondrií na straně recipientní buňky a nastíněny stimuly a faktory, které podněcují donorovu buňku k předání svých mitochondrií.

Mitotransfer probíhá za patologických podmínek jako forma „záchrany“ recipientní buňky, která prochází určitým stresem v důsledku narušení homeostázy. Současně je přenos mitochondrií naprosto normální součástí fyziologických procesů. Je důležité vnímat tento fenomén jako homeostatický, regulační a regenerační prostředek. U buněk, u kterých došlo k poškození mitochondrií, je příjem neporušených mitochondrií možností obnovení mitochondriálních funkcí, a tedy i celkové buněčné homeostázy, a tak i úniku buněčné smrti (shrnutí v: Borchering & Brestoff, 2023). Mnoho dat týkajících se regenerativních vlastností mitochondriálního transferu bylo do dnešní doby vypracováno na modelech patologií zasahujících různorodé tkáně a orgány. Cévní mozková příhoda vede k silnému narušení mitochondriálních funkcí. Mitotransfer z MSC byl jedním z mechanismů, kterým MSC napomohly *in vivo* navrátit funkčnost mitochondriím buněk endotelu cév a také navodily angiogenezi (Liu et al., 2019a). Chemoterapeutická medikace, jako je cisplatina, může mít na pacienta široké vedlejší účinky, především na jeho kognitivní funkce (Chiu et al., 2017). Součástí příčin narušení kognitivních funkcí je i mitochondriální dysfunkce. Příjem mitochondrií neurálními kmenovými buňkami ze strany MSC obnovila optimální mitochondriální potenciál v *in vitro* i *in vivo* modelu terapie cisplatinou (Boukelmoune et al., 2018). Přenos mitochondrií mezi osteocyty umístěnými v propojené dendritické síti je příkladem, že tento proces neprobíhá vždy výlučně mezi odlišnými buněčnými typy (Gao et al., 2019). Jak již bylo zmíněno výše, předávání mitochondrií je formou buněčné komunikace i na fyziologické úrovni. Mitotransfer směřovaný od adipocytů k makrofágům v bílém, a v menší míře i v hnědém, tuku byl součástí mezibuněčné komunikace ve zdravé tkáni *in vivo*. Naopak

při nastolení patologie tukové tkáně, konkrétně obezity, došlo ke snížení mitotransferu. Za jeho poklesem stála omezená schopnost makrofágů přijímat mitochondrie z adipocytů. Schopnost adipocytů předávat mitochondrie v tomto modelu omezena nebyla (Brestoff et al., 2021).

Mitotransfer ale není spojován pouze s pozitivními důsledky. Značné množství studií se zaměřuje na tento proces v asociaci s vysoce energeticky náročným rakovinným bujením. Výkonná buněčná respirace je podmínkou pro úspěšnou karcinogenezi a přenos mitochondrií do rakovinných buněk je jednou z možností, jak udržovat dostatečnou respirační kapacitu. Do podpory rakovinného bujení skrze mitotransfer jsou zapojeny i buňky, které jsou součástí nádorového mikroprostředí. Takovým buněčným typem jsou i s rakovinou asociované fibroblasty, které předáním mitochondrií posílily metastázování buněk rakoviny prostaty. (Ippolito et al., 2019).

Mitotransfer nemá vliv pouze na buňky, které mitochondrie přijímají, ale i na buňky mitochondrie poskytující. Jedná se především o situace, kdy se donorová buňka potřebuje „zbavit“ defektních mitochondrií, a tak se zachránit. Popřípadě má narušené mechanismy spojené s eliminací nefunkčních či nepotřebných mitochondrií. Akceptorem jsou v těchto případech buňky, které poté výkonně degradují defektní mitochondrie mitofágií (shrnutí v: Borchering & Brestoff, 2023). U kardiomyocytů, jež mají narušeny lysozomální funkce, jsou mitochondrie posílány do makrofágů (Liang et al., 2023).

Lze tedy shrnout, že mitotransfer představuje formu mezibuněčné komunikace s významným terapeutickým, ale i regulačním potenciálem. MSC jsou buněčným typem, se kterým se na straně donora mitochondrií pracuje v nespočetném množství studií. Poslední kapitola literárního přehledu této diplomové práce představí postupně struktury, které zprostředkovávají mitochondriální přenos, dále faktory, které ovlivňují jeho navození a průběh, a nakonec imunomodulační účinky mitotransferu zprostředkovaného MSC.

2.3.2 Mechanismy sloužící k přenosu mitochondrií

Buňky využívají pro přenos mitochondrií různorodé cesty. S narůstajícím počtem studií jsou odhalovány nové mechanismy, které mitotransfer zprostředkovávají. Níže budou probrány ty, které jsou do dnešní doby již dobře charakterizovány a jejichž role v tomto procesu byla potvrzena řadou studií. Znalosti v tomto směru ale i tak zaostávají. Dosud není dostatečně podložené např. to, která z buněk iniciuje tvorbu transportních struktur, popřípadě zda se jedná o oboustranný proces (shrnutí v: Borchering & Brestoff, 2023).

2.3.2.1 Tunelové nanotrubičky (TNT)

Tunelové nanotrubičky (tunneling nanotubes – TNT) jsou cytoplazmatické podlouhlé struktury, které přechodně propojují donorovou a akceptorovou buňku, a to i na delší vzdálenosti. TNT byly poprvé objeveny v roce 2004 jako nový prostředek oboustranné mezibuněčné komunikace, jehož základem je aktinová polymerace a přenos organel a váčků je závislý na myosinu (Rustom et al., 2004). TNT byly v souvislosti s mitotransferem podrobně popsány až později, a to v *in vitro* kokultivaci MSC a kardiomyocytů. Elektronová mikroskopie odhalila trubičky, které byly variabilní co do délky i průměru a místy se větvíly. Transfer probíhal jednosměrně, a to z MSC do kardiomyocytů (Plotnikov et al., 2007). *In vivo* potvrzení tvorby TNT odvrátilo obavy, že by jejich tvorba *in vitro* mohla být do jisté míry experimentálním artefaktem (Jackson et al., 2016).

Molekulární mechanismy regulující tvorbu TNT a samotný přenos mitochondrií, jsou doposud málo prozkoumané. Navození tvorby TNT je nejčastěji spojováno se stresovými stimuly, jako je zvýšená koncentrace peroxidu vodíku v médiu (Wang et al., 2010) nebo UV záření (Wang & Gerdes, 2015) *in vitro*. Jak bylo uvedeno výše, přenos nákladu skrze TNT probíhá pomocí motorových proteinů asociovaných s cytoskeletem. TNT mohou mít základ v aktinu, ale i tubulinu (Sartori-Rupp et al., 2019). Minoritně mohou mikrotubuly doprovázet intermediární filamenta a vytvářet propletené helikální struktury (Resnik et al., 2018). Mitochondriální Rho GTPáza 1 (mitochondrial Rho GTPase 1 – Miro1) je adaptor připojující mitochondrii k motorovému proteinu KIF5 pohybujícím se po mikrotubulech. Zvýšená koncentrace Miro1 v donorové buňce pozitivně koreluje se schopností mitotransferu a taktéž s jeho regenerativním a protizánětlivým potenciálem. Miro1 reguluje pouze pohyb mitochondrie po cytoskeletu. Jeho vyřazení nevedlo k postižení samotné tvorby TNT (Ahmad et al., 2014). Regulace probíhá také na úrovni polymerace aktinu TNT. Negativně je tvorba TNT regulována proteinem MICAL2PV, jehož vyřazení výrazně podporuje přenos mitochondrií skrze TNT (Wang et al., 2021).

2.3.2.2 Volné spoje (GJC)

Využití volných spojů (gap junctions – GJC) k přenosu mitochondrií je mechanismem vyžadujícím blízkou vzdálenost dvou buněk a jejich vzájemný kontakt. Základem GJC jsou proteiny konexiny, které oligomerizují a dávají vzniku kanálkovitým GJC. GJC samy o sobě mohou sloužit k transportu velmi malých molekul typu metabolitů či iontů (shrnuto v: Torralba et al., 2016). V mitotransferu zastávají roli zprostředkovatelů buněčného kontaktu mezi donorovou a akceptorovou buňkou, tak aby došlo k cílenému vzniku struktur pro přenos, jako jsou např. TNT. V případě mitotransferu se uplatňují především GJC tvořené konexinem 43 (connexin 43 – Cx43) (shrnuto v: Torralba et al., 2016). BM-MSK využívaly Cx43-GJC pro kontakt s alveolárními buňkami v modelu akutního syndromu dechové tísně. Mitochondrie byly

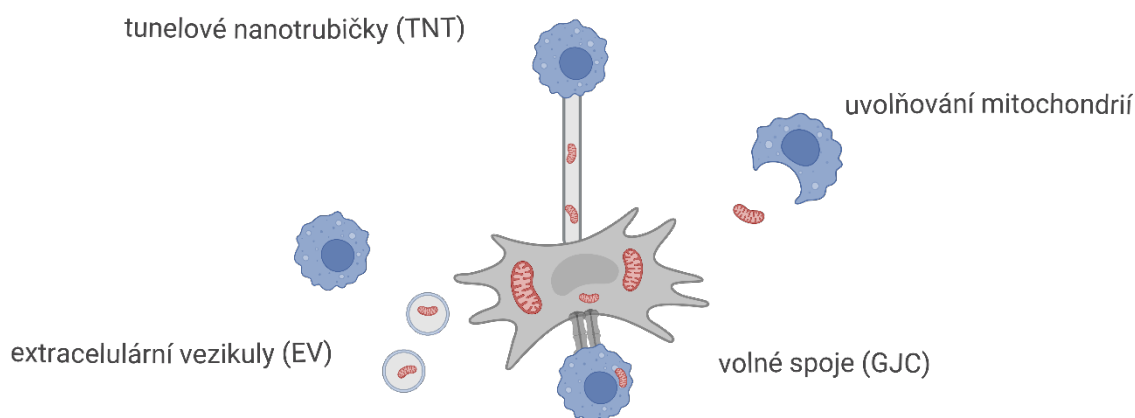
posílány TNT či vezikuly, které byly Cx43 pozitivní, což značí jejich původ v GJC. U poškozených buněk alveol došlo v důsledku mitotransferu k navýšení tvorby ATP (Islam et al., 2012). Podobný průběh byl pozorován i u spojení BM-MSc a neuronů, kde vznikalo heterotypické propojení Cx43 na straně donorové buňky a Cx32 na straně akceptorové buňky. U neuronů v potkaním modelu míšního poranění došlo ke zvrácení apoptózy a k celkové regeneraci lokomočních funkcí organismu (Li et al., 2019a).

2.3.2.3 Extracelulární vezikuly (EV)

Vylučování EV donorovou buňkou, které poté působí na akceptorovou buňku, představuje cestu, která je nezávislá na mezibuněčném kontaktu a byla uvedena již v kapitole pojednávající o MSC. V mitotransferu se uplatňují větší i menší EV, jejichž průměr odpovídá velikosti nákladu. V jejich nitru mohou být přenášeny jak celé mitochondrie, tak jejich části. Zbytky defektních mitochondrií jsou transportovány v malých EV z buňky ven. Taková forma mitotransferu byla pozorována u buněk hnědého tuku, které jsou metabolicky vysoce aktivní, především při probíhající chladové adaptaci. Mitochondrie poškozené metabolickým stresem byly transportovány v EV do TRM hnědého tuku, kde došlo k jejich eliminaci. Eliminace defektních mitochondrií byla tedy přenesena na jiný buněčný typ, čímž došlo k podpoře optimálního průběhu termogeneze v buňkách hnědého tuku (Rosina et al., 2022). EV přenáší i funkční mitochondrie, jako tomu bylo i v případě neurálních kmenových buněk. Kmenové buňky transferem zdravých mitochondrií do somatických buněk s deficientními mitochondriální dědičnou informací, obnovily mitochondriální funkce *in vitro* (Peruzzotti-Jametti et al., 2021).

2.3.2.4 Další mechanismy přenosu

Přenos mitochondrií nemusí vždy vyžadovat tvorbu sofistikovaných struktur. Mitochondrie mohou být uvolňovány donorovou buňkou do svého okolí. Tyto mitochondrie nemají žádné obalové struktury, jsou „nahé“. O cestě, která vede k tomuto uvolňování, se stále ví velmi málo. Předpokládá se ale zapojení sekretorních drah buňky. Nedostatek znalostí se pojí také s osudem mitochondrie v recipientní buňce (shrnutí v: Borcharding & Brestoff, 2023).



Obr. č. 2: Mechanismy sloužící k přenosu mitochondrií. Vlastní tvorba (vytvořeno v BioRender.com)

2.3.3 Faktory indukující a regulující mitochondriální transfer

O molekulárním pozadí mitotransferu máme zatím jen omezené znalosti. Mezi faktory ovlivňující mitotransfer se dá zařadit již zmíněný adaptorový protein Miro1, jehož vyřazení znemožňuje pohyb mitochondrií po cytoskeletu do recipientní buňky (Ahmad et al., 2014). Je ale zřejmé, že se jedná spíše o obecný regulátor mitochondriální mobility, a ne o faktor, který by byl specifický pro mitotransfer. V souvislosti s iniciací mitotransferu se diskutuje především o zapojení molekul, jejichž zvýšené koncentrace jsou asociovány se stresem. Jak bylo dříve zmíněno, stimulem pro přenos mitochondrie může být poškození mitochondrií donorové buňky. V takovém případě se buňka defektních mitochondrií zbavuje. Současně se předpokládá, že poškození mitochondrie nebo celkový stres na straně recipientní buňky může navodit pomoc od donorové buňky a získání zdravých mitochondrií (shrnuť v: Borchering & Brestoff, 2023). Výzkum v oblasti mitotransferu doposud nepřinesl konkrétnější objevy, tudíž níže bude uvedena jen jedna skupina molekul, jejíž příčinná souvislost s mitotransferem byla dokázána. Již dnes je ale jasné, že regulace mitotransferu je multifaktoriální.

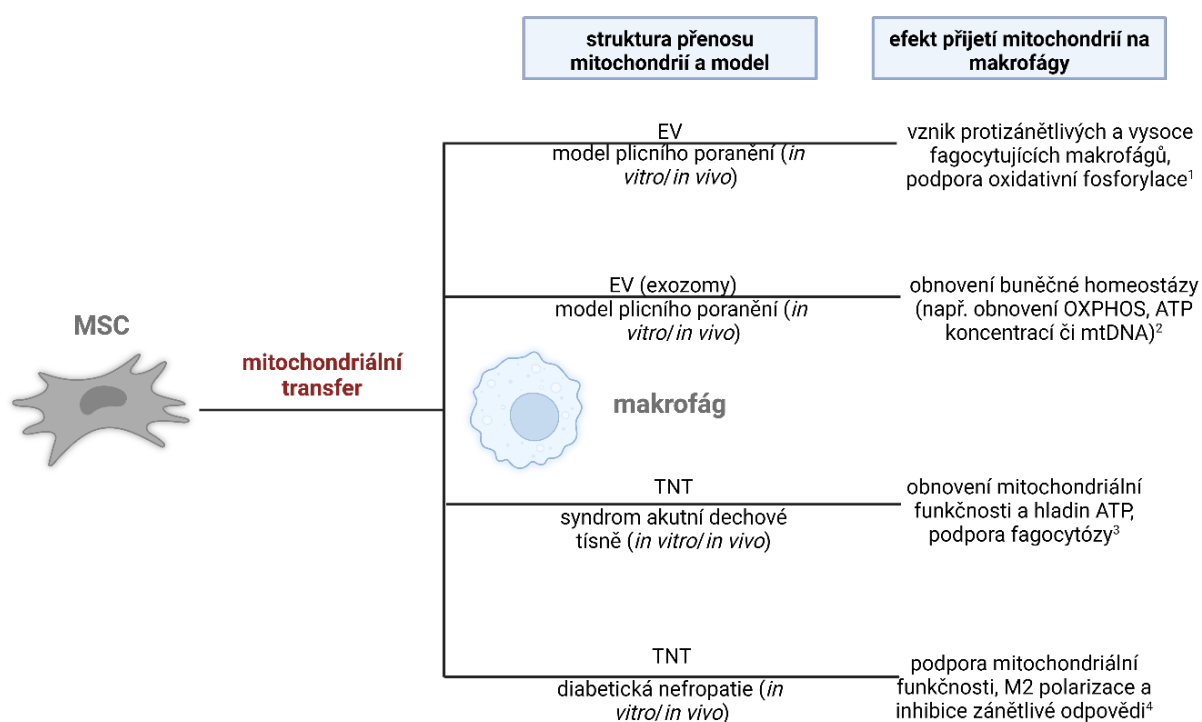
2.3.3.1 *Reaktivní kyslíkové radikály (ROS)*

ROS jsou stresové, signalizační a efektorové molekuly, které vznikají mimo jiné jako vedlejší produkty respiračního řetězce nebo přímou produkcí enzymem NADPH oxidázou. Za fyziologických podmínek jsou produkovány v bazálních koncentracích, kdy plní důležité, především signalizační role. Za patologických podmínek se jejich koncentrace zvyšují natolik, že může docházet vlivem vzniklého oxidativního stresu k poškození buněčných komponent (shrnutí v: Sies & Jones, 2020). Jedním z markerů oxidativního stresu je peroxidace lipidů, která může být důsledkem narušení správného fungování mitochondriálního metabolismu (Park et al., 2021). Produkce ROS tedy souvisí mimo jiné s mitochondriálním respiračním řetězcem a jejich zvýšená tvorba s mitochondriálními dysfunkcemi. Mezi ROS se řadí např.: peroxid vodíku (H_2O_2), superoxid (O_2^-) a hydroxylový radikál ($\text{HO}\cdot$). ROS jsou neutralizovány antioxidantními mechanismy buňky, čímž jsou jejich koncentrace udržovány v optimálních hladinách (shrnutí v: Halliwell, 2023). Při bakteriální infekci organismu došlo k navození mitotransferu z BM-MSC do hematopoetických kmenových buněk. Jedním ze signálů regulujících toto navození byly zvýšené hladiny superoxidu, jelikož při experimentálním navýšení hladin ROS došlo k významnému nárůstu mitotransferu. Mitotransfer tak v modelu stresové hematopoézy napomáhá rychlé tvorbě efektorových buněk z hematopoetických kmenových buněk, což je energeticky náročný proces (Mistry et al., 2019). Regulace mitotransferu oxidativním stresem byla pozorována i u leukemického mikroprostředí. Maligní leukemické buňky dostávaly zdravé mitochondrie z BM-MSC. Mitotransfer byl inhibován při experimentálním potlačení produkce ROS v leukemických buňkách. Konkrétní regulační molekulou byl opět superoxid hromadící se v buňkách leukemie (Marlein et al., 2017).

2.3.4 *Imunoregulační vlastnosti MSC zprostředkované mitochondriálním transferem*

V kapitole pojednávající o MSC a mitotransferu byly představeny regenerativní a imunomodulační účinky těchto buněk. Imunomodulace je zprostředkována i mitotransferem z MSC do buněk v jejich okolí. Ačkoliv je tato imunomodulační cesta stále málo zmapovaná, je důležité brát ji jako rovnocennou k ostatním mechanismům imunomodulace, jako je např. sekrece solubilních faktorů. Imunomodulace mitotransferem se dotýká buněk přirozené i adaptivní imunity a bývá typicky protizánětlivého charakteru. Mitochondrie jsou z MSC předávány např. do zánětlivých Th17 buněk, což má protizánětlivý účinek. Th17 buňky obsahující dárce mitochondrie produkovaly nižší množství prozánětlivého cytokinu IL-17 v porovnání s těmi, které mitochondrie neobdržely. Th17 buňky také přecházely do fenotypu T regulačních buněk, čímž byl zánět dále potlačován (Luz-Crawford et al., 2019). Zánětlivé procesy byly inhibovány také při mitotransferu do Th1 buněk, a to přes utlumení exprese T-bet

transkripčního faktoru, který je důležitý pro regulaci produkce IFN- γ (Akhter et al., 2023). Recipientní buňky nepředstavují pouze CD4⁺ T buňky, ale i T buňky z řad CD8⁺. Závěry studie provedené na mitotransferu z MSC do cytotoxických T buněk popisují stejný mechanismus imunosuprese jako studie na Th1 buňkách, tedy supresi exprese T-bet (Vaillant et al., 2024). Z buněk přirozené imunity lze zmínit např. makrofágy, na nichž byla provedena většina studií. Mitotransfer do makrofágů podporuje polarizaci do M2 protizánětlivého fenotypu (Morrison et al., 2017), s čímž souvisí i pozorovaná zvýšená schopnost fagocytózy (Jackson et al., 2016).



Obr. č. 3: Shrnutí vybraných pozorování vlivu mitochondriálního transferu z MSC na makrofágy.
 Vlastní tvorba (vytvořeno v BioRender.com). Zdroje: 1. (Jackson et al., 2016), 2. (Morrison et al., 2017), 3. (Xia et al., 2022), 4. (Yuan et al., 2021)

3. Cíle diplomové práce

Imunomodulační působení MSC zprostředkované mitotransferem bylo již prokázáno mnoha studiemi. Mitotransfer z MSC do makrofágů má dle doposud dostupné literatury protizánětlivý charakter a podporuje polarizaci do protizánětlivých fenotypů. Konkrétnější obraz pozadí mitotransferu z MSC do makrofágů ale chybí. Základní hypotézou bylo, že preference mitotransferu z MSC by se mohla lišit mezi tkáňovými makrofágy a také mezi polarizovanými makrofágy. Diplomová práce využívá spektrum metod k dosažení následujícího:

- I. Zjištění, zda se preference mitotransferu z MSC liší mezi jednotlivými makrofágy izolovanými z vybraných tkání nebo orgánů *in vitro*.
- II. Pozorování, zda se preference mitotransferu z MSC liší mezi jednotlivými polarizovanými makrofágy *in vitro*.
- III. Analýzy preference mitotransferu z MSC do makrofágů izolovaných z vybraných tkání nebo orgánů *in vivo*.
- IV. Detekce možných faktorů, které se podílí na navození mitotransferu z MSC do makrofágů a rozhodují o jeho preferenci.

4. Materiály a metody

4.1 Zvířata

V *in vitro* a *in vivo* experimentech byly použity 7-12 týdnů staré myši inbrední linie BALB/c, obou pohlaví. Získány byly od společnosti AnLab s.r.o. (Praha, Česká republika). Jako zdroj MSC pro *in vivo* experimenty byly použity *Mito::mKate2* transgenní myši, jejichž mitochondrie konstitutivně exprimují červeně fluoreskující protein mKate2, což umožňuje vizualizaci mitochondrií (Barrasso et al., 2017). *Mito::mKate2* myši byly poskytnuty laboratoří Molekulární terapie Biotechnologického ústavu AVČR pod vedením prof. Jiřího Neužila.

4.2 Média a roztoky

4.2.1 Média

Na kultivaci MSC byl použito médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium; Biosera, Cholet, Francie; katalogové č.: LM-D1111/500) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (fetal bovine serum – FBS; Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA; katalogové č.: A5256701), 10 mM HEPES pufru (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Carl Roth, Karlsruhe, Německo; katalogové č.: R6763.2) a antibiotik penicilinu (100 U/ml; Merck and Co., St. Louis, Missouri, USA; katalogové č.: P8721) a streptomycinu (100 mg/ml; Merck; katalogové č.: S6501).

Na kultivaci makrofágů a na kokultivační experimenty bylo použito médium RPMI (Roswell Memorial Park Institute 1640 medium; Merck; katalogové č.: R8758) s přidaným 10% FBS, HEPES puftrem (10 mM), β -merkapt ethanol (0,05 mM; Merck; katalogové č.: M3148) a antibiotiky penicilinem (100 U/ml) a streptomycinem (100 mg/ml). Na izolaci orgánů a výplach peritonea bylo použito 0% či 5% RPMI se stejnými přidanými složkami, které byly uvedeny.

4.2.2 Roztoky

- 1% fosfátový pufr (phosphate buffer solution – PBS) – pH 7,2-7,4
 - 10 mM fosfát
 - 2,7 mM KCl
 - 37 mM NaCl
- 1% ACK lyzační pufr (ammonium-chloride-potassium buffer)
 - 1,5M ammoniumchlorid (NH_4Cl)
 - 100mM kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)
 - 10mM Triplex111 (EDTA-2Na)

- Roztok pro enzymatické štěpení jater a tuku (optimalizovaný v naší Laboratoři Imunoregulací)
 - HBSS bez iontů (Hanks' Balanced Salt Solution; Thermo Fisher Scientific; katalogové č.: 14025092)
 - kolagenáza D (1 mg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; katalogové č.: 11088858001)
 - kolagenáza I (0,25 mg/ml; Sigma; katalogové č.: C2674)
 - DNáza (0,1 mg/ml; Sigma; katalogové č.: 11284932001)

- Roztok pro analýzu s využitím fluorescenčně aktivované buněčné separace (fluorescent-activated cell sorting – FACS)
 - HBSS (bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; 40 ml)
 - FBS (500 μl)
 - DNáza (20 μl)

- Griessova reakce
 - Roztok A – 0,5 g sulfanilamid (Merck; katalogové č.: S9252), 1,5 ml H_3PO_4 , 48,5 TK vody
 - Roztok B – 0,15 g N-1-naftylendiamin (Merck; katalogové č.: N9125), 1,5 ml H_3PO_4 , 48,5 TK vody

4.3 Technické vybavení

Laminární box CleanAir (Schoeller Instruments s.r.o., Praha, Česká republika)

Laminární box SafeFAST premium (DASIT group, Cornaredo, Italy)

CO_2 inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan)

Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)

Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Termoblok Eppendorf, ThermoMixer C (Merck)

Vortex Mixer MX-S (DLAB Scientific, Beijing, China)

Průtokový cytometr LSR II (BD Biosciences, East Rutherford, New Jersey, USA)

Sorter SONY MA900 (Minato, Tokio, Japan)

Mikroobjemový UV-Vis Spektrofotometr NanoDrop One/OneC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

LightCycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Switzerland)

Fluorescenční a optický mikroskop Leica Dmi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

Spektrofotometr Microplate reader ELx800 (Biotek, Winooski, Vermont, USA)

4.4 Software

Program pro ovládání průtokového cytometru LSR II (BD) - FACSDiva Software (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)

Program pro analýzu dat z průtokové cytometrie – FlowJo v 10.10

Program pro ovládání sorteru SONY MA 900

Program pro ovládání LightCycler 480 II a analýzu dat – LightCycler 480 (Roche)

Program pro ovládání spektrofotometru Microplate reader ELx800 a analýzu dat – Revelation Quicklink (Dynex Technologies, Chantilly, Virginie, USA)

Program pro statistickou analýzu – GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, LA Jolla, CA, USA)

4.5 Izolace imunitních buněk z orgánů

Myši z kmene BALB/c byl proveden výplach peritonea a byly odebrány následující orgány či tkáně: slezina, játra, peritoneální viscerální bílý tuk (peritoneal white adipose tissue – pWAT) a kosti *tibia* a *femur* z obou dolních končetin pro získání kostní dřeně (bone marrow – BM). Všechny orgány a tkáně byly mechanicky homogenizovány. BM byla izolována výplachem kosti RPMI. Játra a pWAT byly po mechanickém zpracování štěpeny enzymaticky. Enzymatické štěpení bylo podpořeno zvýšenou teplotou umístěním na termoblok (1 hodina, 37 °C). Zhomogenizované orgány byly přefiltrovány přes nylonovou gázu do zkumavky. Játra byla filtrována přes nylonovou gázu a poté přes 70 µm a 40 µm filtr. Po přefiltrování byly buněčné suspenze naředěny RPMI a centrifugovány (8 °C, 8 min, 170 g). Po centrifugaci byl odlit supernatant a peleta byla resuspendována v RPMI. U více prokrvených orgánů, tedy jater a sleziny, byla peleta resuspendována v 1% ACK pufru (3 ml, 3 min). Po působení byl ACK pufr blokován přidáním RPMI, suspenze byla centrifugována, supernatant odlit a peleta resuspendována v RPMI. Buněčné suspenze z jednotlivých orgánů byly nasazeny na 12

jamkovou destičku (Nunc, Roskilde, Dánsko) a kultivovány v inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) po dobu 24 hodin, nebo byly dále zpracovány pro analýzu pomocí průtokové cytometrie (flow cytometry – FC).

4.6 Izolace kostní dřeně a její zamražení

BM byla rutinně zamrazována pro následné rychlejší použití na generaci makrofágů odvozených z BM (bone marrow-derived macrophages – BMdM). Po izolaci BM (dle protokolu 4.5) byla buněčná suspenze centrifugována (8 °C, 8 min, 170 g) a peleta resuspendována ve FBS. Do suspenze byl před zamražením přidán dimethylsulfoxid (DMSO; Merck; katalogové č.: 67-68-5). Na 24 hodin byla buněčná suspenze v kryozkumavce zamrazena v -80 °C, poté byla skladována v -150 °C.

4.7 Izolace mesenchymálních kmenových buněk

MSC pro *in vitro* experimenty byly izolovány z myší kmene BALB/c. Izolaci a kultivaci MSC prováděla technická pracovnice. MSC byly izolovány z podkožního tuku (ASC) v tříselné oblasti. Izolace probíhala dle dlouhodobě zavedeného protokolu naší laboratoře. To, že tímto protokolem jsou doopravdy získávány buňky vykazující fenotyp MSC, bylo také potvrzeno v naší laboratoři (Hajkova et al., 2017a, 2017b) a experimentální část této diplomové práce se fenotypizaci nadále nevěnovala. MSC pro *in vivo* experimenty byly izolovány z *mito::mKate2* transgenních myší dle stejného protokolu.

4.8 Diferenciace makrofágů z BM a polarizace makrofágů

Buněčná suspenze z BM byla rozmrazena, přepipetována do zkumavky, doplněna médiem a centrifugována (8 °C, 8 min, 170 g). Po centrifugaci byla peleta resuspendována v RPMI a doplněna do objemu 8 ml. Suspenze byla přenesena na kultivační láhev (Thermo Fisher Scientific, Biolite; katalogové č.: 130189) a kultivována v inkubátoru po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byl k buněčné suspenzi přidáno médium obohacené z 20 % o M-CSF, které bylo získáno dle postupu zavedeného v laboratoři (Vašek et al., 2024). Po 48 hodinách byla odebrána polovina objemu buněčné suspenze a přidáno nové M-CSF v RPMI. Po týdnu od rozmražení bylo odlito médium z láhve, buňky omyty PBS a bylo přidáno čerstvé RPMI. Buňky byly mechanicky sklizeny, přepipetovány do zkumavky a centrifugovány. Po centrifugaci byla peleta resuspendována v RPMI. Buňky byly nanесeny na Bürkerovu komůrku, spočítány, buněčná suspenze byla naředěna dle požadavků následujícího experimentu a buňky byly nasazeny na destičku (Nunc, Roskilde, Dánsko) s počtem jamek dle požadavků následujícího experimentu (viz tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Nasazení makrofágů na kultivační destičky

experiment	počet makrofágů	typ destičky
produkce NO (Griessova reakce)	$3 \cdot 10^5$ v 0,5 ml RPMI	48 jamková
kokultivační experimenty a fenotypizace (průtoková cytometrie)	$1 \cdot 10^6$ v 1 ml RPMI	24 jamková
fluorescenční mikroskopie	$6 \cdot 10^3$ v 0,5 ml RPMI	24 jamková + krycí sklíčko na dno jamky

Polarizace BMdM do vybraných fenotypů probíhala působením vybraných polarizačních stimulů na buňky nasazené na destičce a je uvedena v tabulce č. 2. Zvolené časy polarizace vychází z optimalizačních experimentů.

Tabulka č. 2: Polarizace BMdM

fenotyp	typ ovlivnění (v PBS)	čas polarizace
M0		
M1	LPS (1,25 µg/ml; Sigma; katalogové č.: L2880) + IFN-γ (20 ng/ml; Thermo Fisher Scientific; katalogové č.: 315-05)	24 hod./48 hod. (Griessova reakce)
M2a	IL-4 (20 ng/ml; Sigma; katalogové č.: 11020)	72 hod.
M2c	IL-10 (20 ng/ml; Sigma; katalogové č.: 13019) + glukokortikoid dexamethason (10 µg/ml; Sigma; katalogové č.: D4902)	72 hod.

4.9 Barvení mitochondrií

Mitochondrie MSC byly barveny fluorescenční barvou MitoTracker Red CMXRos nebo MitoTracker Deep Red FM (v grafech zkráceně MitoT/MitoTDR; Thermo Fisher Scientific; katalogové č.: M46752 pro MitoTracker Red a M46753 pro MitoTracker Deep Red; viz tabulka č. 6) dle konkrétního panelu. Obě barvy fungují na principu pasivní difuze do buňky, kde barví funkční mitochondrie na základě jejich membránového potenciálu. K barvení byl použit 100 nM roztok MitoTracker Red nebo MitoTracker Deep Red v 5% RPMI, který byl přidán do omyté kultivační láhve s MSC. Barvení probíhalo po dobu 30 minut v inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C). Po promytí PBS byly MSC vystaveny působení 0,6 ml trypsinu po dobu 5 minut v inkubátoru. Po trypsinizaci byly MSC mechanicky uvolněny do RPMI. Buněčná suspenze byla přenesena do zkumavky a centrifugována (8 °C, 8 min, 170 g). Peleta byla resuspendována

v RPMI a buňky byly spočítány na Bürkerově komůrce a naředěny dle typu kultivačního experimentu.

4.10 Kokultivační *in vitro* experimenty

Tkáňové makrofágy a polarizované BMdM byly kultivovány s MSC pro následnou analýzu mitotransferu z MSC do makrofágů a oxidativního stresu makrofágů. Všechny kokultivační protokoly dodržovaly stejné parametry, které byly optimalizovány v předešlých experimentech v rámci naší laboratoře a jsou shrnuty v tabulce č. 3. Po kultivaci byly buněčné suspenze analyzovány pomocí FC nebo fluorescenční mikroskopie.

Tabulka č. 3: Parametry kokultivačních experimentů (typ destičky byl uveden v tabulce č. 1)

typ analýzy následující kokultivací	poměr MSC vůči makrofágům	doba kokultivace	podmínky kokultivace v inkubátoru
FC	1:20	90 min	5 % CO ₂ , 37 °C
fluorescenční mikroskopie	1:20	120 min	5 % CO ₂ , 37 °C

4.11 Průtoková cytometrie

FC byla využita pro analýzu povrchových a intracelulárních znaků makrofágů. Dále byly s jejím využitím detekovány mitotransfer a produkce radikálů oxidativního stresu. FC byla využita jako metoda pro analýzu jak *in vitro*, tak *in vivo* experimentů a postupovalo se dle zavedeného protokolu v nesterilní části laboratoře:

- Po *in vitro* kultivaci, nebo po izolaci imunitních buněk v *in vivo* experimentu, vzorky umístit na led a po celou dobu pracovat na ledu
- Buňky z destičky mechanicky sklídit (v případě předchozí kultivace), třikrát promýt PBS a přenést suspenzi do zkumavky
- Centrifugovat (8 °C, 8 min, 170 g)
- Po centrifugaci odlít supernatant a peletu resuspendovat v PBS a doplnit na požadovaný objem pro následné přepipetování na 96 jamkovou destičku s kulatým dnem (Nunc, Roskilde, Dánsko) po 200 µl
- Centrifugovat (8 °C, 3 min, 170 g)
- Supernatant prudce odlít a rozvolnit peletu pomocí vortexu
- Přidat vybrané monoklonální protilátky (monoclonal antibodies – mAB; viz tabulka č. 4; ředění v PBS) a inkubovat po dobu 30 minut ve tmě, v lednici
- Po inkubaci dvakrát promýt 200 µl PBS a mezi promytími centrifugovat (8 °C, 3 min, 170 g)
- Po promytí přidat 200 µl PBS

- Přidat 20 µl barvy Hoechst 33258 (1:40 000; Sigma; katalogové č.: 94403) pro značení mrtvých buněk
- Měřit pomocí FC

Po extracelulárním barvení bylo u některých experimentů ještě provedeno intracelulární barvení. Pokud byly vzorky po extracelulárním barvení barveny ještě intracelulárně, jako barva pro značení mrtvých buněk byla použita fixovatelná LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit barva (1:1000, ThermoFisher Scientific; katalogové č.: L34955). Poté se postupovalo dle následujícího protokolu:

- 100 µl fixačního roztoku (ThermoFisher Scientific; katalogové č.: 00-822-49) do každé jamky a inkubace 10 minut na ledu a 20 minut při pokojové teplotě, po celou dobu ve tmě
- K fixačnímu roztoku po inkubaci přidat 100 µl permeabilizačního roztoku (1:10 v PBS; ThermoFisher Scientific; katalogové č.: 00-8333-56)
- Centrifugovat (8 °C, 4 min, 300 g)
- Supernatant prudce odlít a rozvolnit peletu
- Přidat 200 µl permeabilizačního roztoku a opět centrifugovat, odlít supernatant a rozvolnit peletu
- Přidat vybrané mAb (viz tabulka č. 4; ředění v permeabilizačním roztoku) a inkubovat 30 minut v pokojové teplotě, ve tmě
- Po inkubaci dvakrát promýt 100 µl permeabilizačního roztoku, mezi kroky centrifugovat
- Nakonec přidat 200 µl permeabilizačního roztoku
- Měřit pomocí FC

4.11.1 Fluorescenční značení polarizovaných makrofágů ve společné kultivaci

Pro větší *in vivo* relevanci mitotransferu byly různě polarizované makrofágy (tj. M1, M2a a M2c) kultivovány s MSC v jedné jamce. Polarizované makrofágy byly rozděleny do dvou skupin, které byly poté společně kultivovány s MSC. Před kultivací s MSC byl každý fenotyp fluorescenčně značen jiným fluorochromem F4/80 pro následné rozlišení jednotlivých typů polarizovaných makrofágů při analýze na FC. Poměr 1:20 (viz tabulka č. 1) byl dodržen (1 MSC na 20 makrofágů různých fenotypů). Rozdělení panelu je znázorněno v tabulce č. 5. Po kokultivaci byly buněčné suspenze analyzovány pomocí FC.

4.11.2 Detekce reaktivních forem kyslíku průtokovou cytometrií

Oxidativní stres makrofágů byl analyzován s využitím fluorescenční barvy DCFDA (15 μ M roztok DCFDA v 10% RPMI, viz tabulka č. 6), která je po proniknutí do buňky deacetylována intracelulárními esterázami a po reakci s radikály oxidativního stresu se mění na vysoce fluorescenční DCF. DCFDA je schopna detekovat jak ROS, tak do menší míry i NO a od něj odvozené reaktivní dusíkaté radikály. DCFDA byla vždy přidána do buněčné suspenze 30 minut před přípravou na FC na ledu. U tkáňových makrofágů měření probíhalo až 24 hodin po jejich izolaci a nasazení na destičku, aby se předešlo zkreslení momentálním stresem v důsledku izolace. U makrofágů diferencovaných do různých fenotypů probíhalo měření po uplynutí doby protokolu pro jejich polarizaci. Inkubace s DCFDA probíhala ve tmě v inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C). Po inkubaci bylo postupováno dle protokolu 4.11.

Tabulka č. 4: Seznam použitých mAb

extracelulární znaky	fluorochrom	ředění	klon	výrobce	katalogové číslo
CD45	A700	1:150	30:F11	BioLegend	103128
F4/80	APC	1:50	BM8	BioLegend	123115
F4/80	FITC	1:50	BM8	Sony	1215535
F4/80	PE	1:100	BM8	BioLegend	123109
F4/80	PE Dazzle594	1:80	BM8	BioLegend	123145
F4/80	PE/Cy5	1:80	BM8	BioLegend	121311
MHC II. třídy	FITC	1:75	M5/114.15.2	BioLegend	107605
CD80	APC	1:80	16-10A1	BioLegend	104714
CD80	FITC	1:80	16-10A1	BioLegend	104705
CD40	PE	1:60	3/23	BioLegend	1246100
CD200	PE	1:80	OX-90	BioLegend	123807
CD163	PE	1:100	TNKUPJ	eBioScience	61-1631-82
MerTK	SB600	1:50	DS5MMER	eBioScience	63-5751-82
intracelulární znaky					
IL-1β	FITC	1:80	NJTEN3	Invitrogen	11-7114-82
IL-6	APC	1:80	MP5-20F3	BioLegend	504507
TNF-α	PE	1:100	TN3-19.12	Invitrogen	12-7423-41
IFN-γ	FITC	1:100	XMG1.2	eBioScience	FITC-65153
iNOS	Alexa Fluor 488	1:100	CXNFT	Invitrogen	53-5920-82
Arg1	PE	1:80	AlexF5	Invitrogen	25-3697-82

Tabulka 5: Fluorescenční značení fenotypů makrofágů pro kokultivační experiment s MSC

skupina I (MSC + skupina I)	mAb a fluorochrom	skupina II (MSC + skupina II)	mAb a fluorochrom
M0	F4/80 (PE)	M1	F4/80 (FITC)
M1	F4/80 (FITC)	M2a	F4/80 (PE)
M2c	F4/80 (PE Dazzle)	M2c	F4/80 (PE Dazzle)

Tabulka 6: Seznam použitých fluorescenčních značení

fluorescenční barva	ex/em spektrum (nm)	koncentrace	značení	výrobce	katalogové číslo
MitoTracker Red CMXRos	581/644	100 nm	funkční mitochondrie (dle potenciálu)	Invitrogen	M7512
MitoTracker Deep Red FM	644/655	100 nm	funkční mitochondrie (dle potenciálu)	Invitrogen	M22426
mKate2	561/619		mitochondrie (masa, nezávisle na funkčnosti)		
DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)	492/527	150 μ M	oxidativní stres (ROS a NO)	Invitrogen	C369

4.12 Inhibice produkce ROS a NO makrofágy

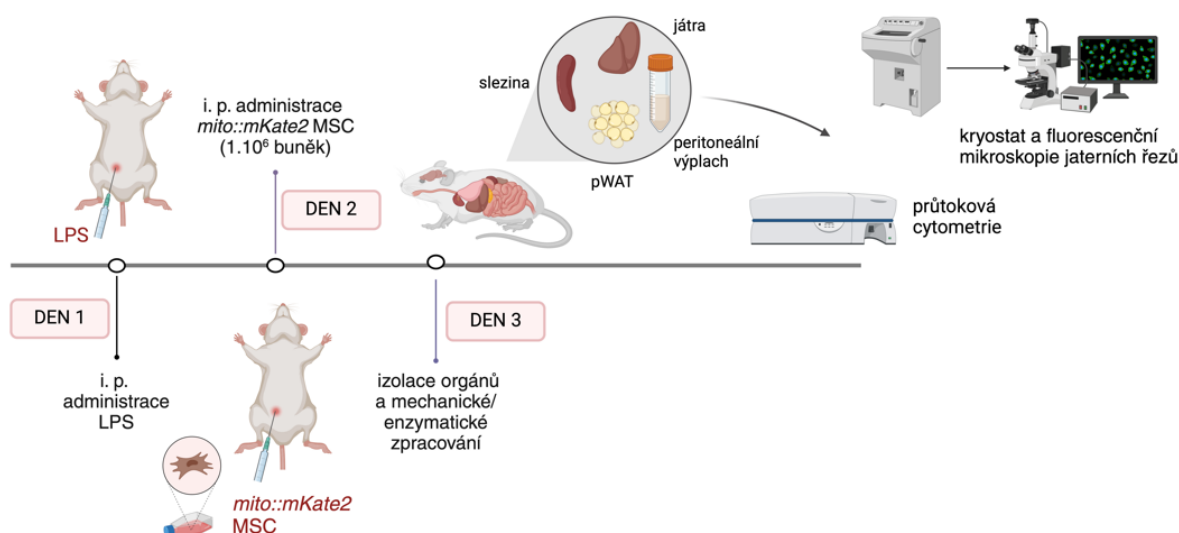
Inhibice ROS a NO byla provedena pro ověření teorie souvislosti mitotransferu a produkce stresových molekul. Jako inhibitory byly použity: 1400W pro inhibici produkce NO (N-(3-Aminomethyl)benzylacetamidin, 2HCl; specifický inhibitor iNOS; Scintila; katalogové č.: HY-18731) a NAC jako obecný antioxidant (N-acetyl-L-cystein; Merck; katalogové č.: 38520-57-9). NO bylo inhibováno z důvodu, že fluorescenční barva DCFDA, která byla použita jako detektor produkce ROS, detekuje v menší míře i NO, a může tak zkreslovat výsledky. Inhibitory byly přidávány buď samostatně, nebo v kombinaci. Pro inhibiční experiment byly použity kontrolní makrofágy (nepolarizované BMdM) a M1 makrofágy z důvodu, že produkce ROS a NO je jednou z jejich efektorových mechanismů. M1 makrofágy byly polarizovány po dobu 48 hodin. Tabulka č. 7 shrnuje použité koncentrace a časy působení inhibitorů, které byly ustanoveny po optimalizaci. Po působení inhibičních činidel byly makrofágy kultivovány s MSC (dle protokolu 4.10) a barveny pro detekci ROS (viz 4.11.2). Po kultivaci bylo postupováno dle protokolu FC (viz 4.11).

Tabulka č.7.: Tabulka znázorňující rozmístění inhibitorů v rámci destičky. Zkratky: x (nebyl přidán žádný inhibitor), K (kontrola, tedy nepolarizované BMdM)

K x	K + 1400W (10 μM; 24 hod.)	K + NAC (5 mM; 8 hod.)	K + 1400 W (10 μM; 24 hod.) + NAC (5 mM; 8 hod.)
M1 x	M1 + 1400W (10 μM, 24 hod.)	M1 + NAC (5 mM; 8 hod.)	M1 + 1400W (10 μM; 24 hod.) + NAC (5 mM; 8 hod.)

4.13 Stanovení mitochondriálního transferu v *in vivo* modelu

Pro detekci mitotransferu v *in vivo* systému byl použit myši BALB/c model zánětu navozeného LPS (Jiao et al., 2024). První den byl myším intraperitoneálně (i. p.) aplikován LPS (3 mg/kg; LPS ředěn ve sterilním PBS). Kontrolním jedincům byl injikován sterilní PBS (K jedinci). Po 24 hodinách byly myším s navozeným zánětem i. p. transplantovány MSC (LPS+MSC jedinci) izolované z *mito::mKate2* transgenní myši ($1 \cdot 10^6$ ve 200 μ l sterilního PBS). Kontrolním jedincům s navozeným zánětem pro mitotransfer byl injikován sterilní PBS (LPS jedinci). Po 48 hodinách od navození zánětu LPS byly myši usmrceny. Byl proveden výplach peritonea a byly izolovány vybrané tkáně a orgány související s peritoneální dutinou (pWAT, játra, slezina), které byly zpracovány dle protokolu 4.5 a analyzovány pomocí FC. Z vybraných LPS+MSC myši byl odebrán levý jaterní lalok, který byl následně zpracován na kryorezy. Design experimentu je shrnut na obrázku č. 4.



Obrázek. č. 4: Design experimentu mitotransferu v *in vivo* modelu (vlastní tvorba v Biorender. com)

4.13.1 Příprava vzorků jater na kryorezy

Z levého jaterního laloku byl příčně skalpelem uříznut jeho konec, který byl následovně fixován: omytí PBS, 12 hodin 4% paraformaldehyd, 60 minut 0% cukróza, 12 hodin 20% cukróza. Po fixaci byly vzorky jater umístěny do Tissue-Tek® O.C.T. směsi (Sakura Finetek Inc., California, USA; katalogové č.: 4583), prudce zmrazeny na suchém ledu a uchovávány v -75°C . Vzorky jater byly zpracovány na kryostatu na 5 μ m řezy, které byly 15 minut fixovány ve 4% paraformaldehydu a poté uchovávány v -75°C .

4.14 Restimulace

Pro měření intracelulárních znaků byly makrofágy restimulovány. K buněčné suspenzi byly přidány: PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 20 ng/ml; Merck; katalogové č.: P8139), ionomycin (500 ng/ml; Merck; katalogové č.: I0634) a brefeldin A (5 µg/ml; Invitrogen; katalogové č.: 00-4506-51). Restimulace působila po dobu 4,5 hodin. Po restimulaci bylo postupováno dle protokolu na FC (viz 4.11)

4.15 Fluorescenčně aktivovaná buněčná separace (sort)

FACS byl využit pro izolaci makrofágů z buněčných suspenzí získaných z jednotlivých orgánů a tkání pro následné využití při izolaci RNA. Buňky byly z myši izolovány dle stejného protokolu, který byl uveden v 4.5. Poté bylo postupováno následovně:

- Po poslední centrifugaci, odlití supernatantu a resuspendaci přenést buněčnou suspenzi do mikrozkušavky (eppendorfka) a centrifugovat (8 °C, 4 min, 170 g)
- Po centrifugaci opatrně odpipetovat supernatant
- Peletu resuspendovat ve 100 µl roztoku pro FACS (složení uvedeno ve 4.2.2)
- V tomto roztoku barvit buňky na CD45 a F4/80 po dobu 30 minut v lednici, ve tmě
- Po inkubaci dvakrát promýt 100 µl roztoku pro FACS, mezi kroky centrifugovat
- Analyzovat pomocí FACS

Izolovány byly F4/80⁺ / CD45⁺ buňky do 50 µl FBS (průměrně 100 000 buněk).

4.16 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time polymerase chain reaction – qPCR) byla využita pro určení antioxidační kapacity tkáňových makrofágů. Nejprve byla z tkáňových makrofágů získaných pomocí FACS izolována RNA, která byla přepsána do cDNA. Následně byla relativní exprese detekována pomocí qPCR.

4.16.1 Izolace RNA

Po izolaci makrofágů do séra (viz 4.15) byla buněčná suspenze centrifugována (8 °C, 8 min, 170 g) a supernatant opatrně odpipetován. Následně bylo postupováno dle protokolu pro izolaci RNA s využitím RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Hilden, Německo; katalogové č.: 74104):

- Peletu resuspendovat v RLT pufru s přidáním β-merkptoethanolem a suspenzi homogenizovat (vortex) za účelem lyze buněk a uvolnění RNA

- Přidat 70% ethanol a propipetovat
- Vzorek přenést na kolonku s filtrem (RNeasy MinElute spin column) vloženou do sběrné zkumavky, zavřít víčko kolonky a centrifugovat (pokojová teplota, 15 s, 8 000 g)
- Přidat RW1 pufr na kolonku s filtrem a centrifugovat
- Na kolonku přidat inkubační směs RDD pufru a DNázy I a inkubovat 15 minut v pokojové teplotě
- Po inkubaci přidat RW1 pufr a centrifugovat
- Přidat RPE pufr a centrifugovat
- Přidat 80% ethanol a centrifugovat (pokojová teplota, 2 min, 8 000 g)
- Otevřít víčko kolonky a centrifugovat do úplného vysušení filtru kolonky (pokojová teplota, 15 min, 8 000 g)
- Sběrnou zkumavku vyměnit za novou zkumavku, do které bude přefiltrován vzorek s RNA
- Na kolonku nalít sterilní PCR vodu (bez RNáz) a centrifugovat (pokojová teplota, 1 minuta, 14 000 g)
- Koncentraci RNA určit pomocí Nanodrop přístroje a skladovat v -75 °C, nebo ihned provést reverzní transkripci do cDNA

4.16.2 Reverzní transkripce

Získaná RNA byla přepsána do cDNA s využitím kitu SuperSkript IV RT (Invitrogen, Praha, Česká republika; katalogové č.: 18-090-010). Z důvodu nízké výtěžnosti RNA z tkáňových makrofágů byly některé koncentrace upraveny. Postupováno bylo dle následujícího protokolu (objemy jsou uváděny na jeden vzorek):

- Připravit si první premix: 1 µl random primerů (50 µM; Thermo Fisher Scientific; katalogové č.: 48190011), 1 µl deoxynukleotidů (10 mM; Thermo Fisher Scientific; katalogové č.: R0192) a přidat z premixu po 2 µl do 11 µl vzorku RNA
- Směs zahřát v thermocycleru na 65 °C na 5 minut, poté vzorky umístit na led na 1 minutu
- Připravit si druhý premix: 7,27 µl 5x SSIV pufr, 1,82 µl (100 mM), 0,5 µl inhibitoru RNáz a 1 µl SuperScript IV RT (Invitrogen; katalogové č.: 18090050) a přidat z premixu 10,59 µl do vzorku RNA
- Směs umístit do thermocycleru (25 °C na 5 minut, 50 °C na 60 minut, 75 °C na 15 minut)

- Přepsaný vzorek do cDNA uchovávat v -20 °C a použít na qPCR

4.16.3 Určení relativní exprese genu metodou qPCR

Relativní exprese vybraných genů u tkáňových makrofágů byla určena metodou qPCR, která byla provedena na přístroji LightCycler 480 II. Seznam primerů a house-keeping genů je uveden v tabulce 8. Bylo postupováno dle následujícího protokolu (objemy jsou uváděny na jeden vzorek):

- cDNA vzorek rozmrazit
- Připravit premix pro každý primer (množství napočítat dle počtu vzorků v triplicátech): 4 µl sterilní PCR vody (bez RNáz), 4 µl 5x HOT FIFEPol EvaGreen (Solid Biodyne, Tartu, Estonia; katalogové č.: 08-36-00001), 1 µl primeru (forward + reversed, 100 µM)
- Na 384 jamkovou destičku napipetovat vzorek po 1 µl, poté přidat 9 µl premixu daného primeru/genu
- Preinkubace 10 minut v teplotě 95 °C
- Nastavit 50 cyklů s konfigurací: 95 °C po 10 sekund, 60 °C po 30 sekund, 72 °C po 1 sekundu
- Zchladit na 40 °C
- Analyzovat

Tabulka č. 8: Seznam genů/primerů pro qPCR

název genu/primeru	sekvence primeru
<i>Aktin (Akt; house-keeping)</i>	ATGGAGCCACCGATCCACA CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
<i>Kataláza (Cat)</i>	TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG AGCGACCAGATGAAGCAGTG
<i>Superoxid dismutáza 1 (SOD1)</i>	CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC
<i>Superoxid dismutáza 2 (SOD2)</i>	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT CAGACCTGCCTTACGACTATGG

4.17 Griessova reakce

Griessova reakce byla využita pro určení koncentrace NO v médiu v rámci fenotypizace polarizovaných makrofágů. Po kultivaci a polarizaci makrofágů na 48 jamkové destičce (Nunc, Roskilde, Dánsko) bylo 100 µl supernatantu od každého fenotypu napipetováno na 96 jamkovou destičku s plochým dnem (Nunc, Roskilde, Dánsko). Roztok NaNO₃ (Merck, katalogové č.: 7631-99-4) byl užit jako standard a 10% RPMI jako blank. Byla vytvořena koncentrační řada standardu, která byla také napipetována na destičku po 100 µl. Do všech jamek bylo přidáno 50

μl roztoku A a 50 μl roztoku B (viz 4.2.2). Následovala inkubace po dobu 5 minut. Poté byly vzorky analyzovány spektrofotometrem ve vlnové délce nastavené na 570 nm.

4.18 Fluorescenční mikroskopie

4.18.1 Fluorescenční mikroskopie *in vitro* kultivace MSC a makrofágů

Fluorescenční mikroskopie byla využita pro pozorování mitotransferu ve společné kultivaci MSC a M1 makrofágů *in vitro* a na mikroskopickou analýzu jaterních řezů z *in vivo* modelu mitotransferu.

- Po kokultivaci (viz 4.10) buňky adherující na sklíčku promýt PBS
- Fixovat 4% paraformaldehydem (objem, který pokryje dno se sklíčkem)
- Inkubovat 15 minut ve tmě
- Odsát paraformaldehyd, vymýt PBS
- Dvakrát na 3 minuty přidat 500 μl 0,2% roztoku Tritonu X-100 (Merck, katalogové č.: 9036-19-5) v PBS a 5% BSA
- Přidat primární mAb (seznam použitých mAb viz tabulka č. 9) a inkubovat 60 minut v lednici, ve tmě
- Dvakrát promýt PBS
- Přidat sekundární mAb, inkubace 60 minut v lednici, ve tmě
- Dvakrát promýt PBS a osušit
- Přidat 30 μl Mowiolu (Calbiochem, Billerica, MA, USA; katalogové č.: 47-590-4) s DAPI (1 μg/ml, 4,6-diamino-2-phenylindole; IBIDI, Gräfelfing, Germany; katalogové č.: 50011)
- 10 minut v lednici
- Mikroskopovat na fluorescenčním mikroskopu Leica Dmi8

4.18.2 Fluorescenční mikroskopie jaterních řezů

MSC byly před injekcí obarveny MitoTracker Red CMXRos pro označení funkčních mitochondrií, ale také CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, ThermoFisher; katalogové č.: C34570). CFSE je fluorescenční barvivo, které se váže na aminoskupiny proteinů a slouží ke sledování buněčného dělení (v našem protokolu ke sledování živých MSC v tkáni). Samotné řezy byly poté barveny pouze na DAPI, následně inkubovány 10 minut v lednici a mikroskopovány fluorescenčním mikroskopem Leica Dmi8.

Tabulka č. 9: Použité primární a sekundární protilátky v mikroskopii

primární protilátky	cíl	ex/em spektrum (nm)	ředění	značení	výrobce
F4/80	rat anti mouse		1:75	makrofágy	BioRad; katalogové č.: MCA497GA
α -tubulin	mouse anti mouse		1:200	cytoskelet	Invitrogen; katalogové č.: 62204
sekundární protilátky					
Alexa 647	goat anti rat	647/670	1:400		Invitrogen; katalogové č.: A-21247
Alexa 594	chicken anti rat	594/620	1:400		Invitrogen; katalogové č.: A-21471
Alexa 488	goat anti mouse	488/520	1:400		Invitrogen; katalogové č.: A-11001

4.19 Statistická analýza

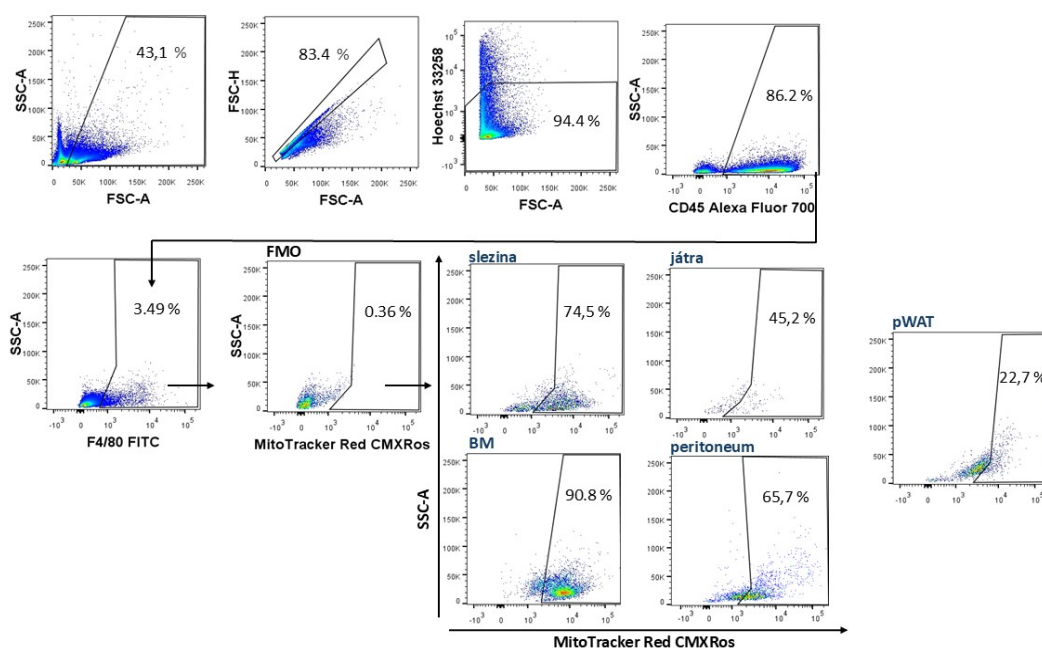
Statistika dat této diplomové práce byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 8. Před provedením statistické analýzy bylo zkontrolováno, zda data vykazují normální rozdělení pomocí Shapiro-Wilkova testu normality. Ze statistických testů byl využit jednosměrný ANOVA test (Analysis of variance, jednosměrná analýza rozptylu; Tukeyho test), nebo párový t-test. V případě nenormálního rozdělení dat byl použit neparametrický test (Kruskal-Wallisův test a Dunnův post-hoc test). Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ byly označeny jako signifikantní.

5. Výsledky

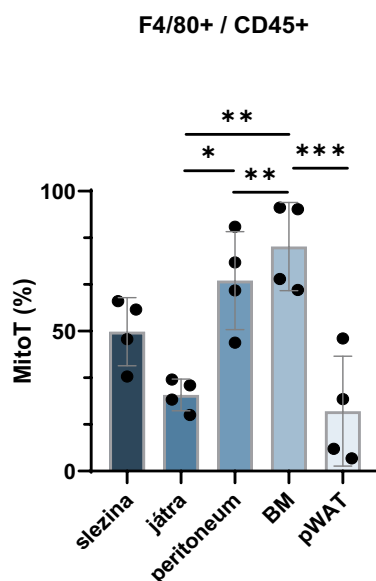
Mitochondriálním transferem se v naší laboratoři zabýváme v rámci širšího projektu. Data, která jsou uvedena v této práci, jsou pouze ta, která byla získána mnou. Výsledky jsou rozděleny do třech hlavních částí: mitochondriální transfer do tkáňových makrofágů *in vitro*, mitochondriální transfer do polarizovaných makrofágů *in vitro* a mitochondriální transfer v *in vivo* modelu.

5.1 Mitochondriální transfer do tkáňových makrofágů (*in vitro*)

Prvním experimentem jsme chtěli zjistit, zda se mitotransfer z MSC liší ve své preferenci mezi makrofágy izolovanými z vybraných tkání s využitím FC (viz obr. č. 5). Výsledky dokázaly probíhající mitotransfer z MSC do makrofágů (F4/80⁺ / CD45⁺) a také ukázaly kvantitativní rozdíly v přenosu mitochondrií v souvislosti s tkáňovým původem makrofágů. Nejvyšší mitotransfer byl pozorován do makrofágů izolovaných z BM, po níž následovalo peritoneum a slezina. Naopak signifikantně nižší mitotransfer probíhal do jater a pWAT (viz obr. č. 6).



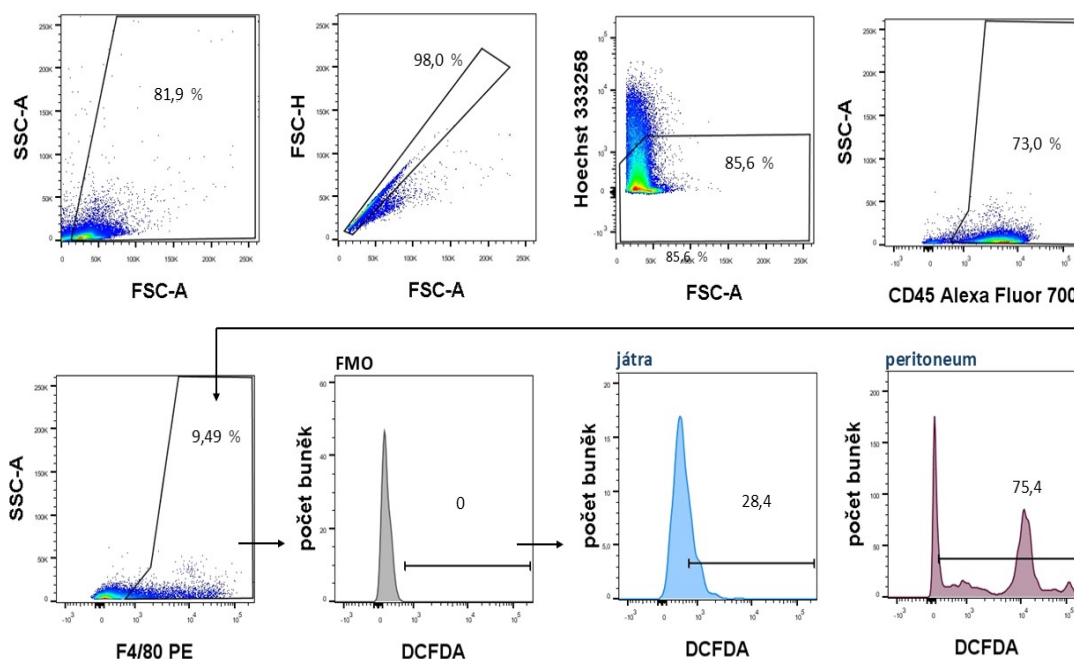
Obr. č. 5: Ukázka gatovací strategie mitochondriálního transferu do tkáňových makrofágů (F4/80⁺ / CD45⁺). Buňky byly gatovány pomocí parametrů side a forward scatter (SSC-A a FSC-A), singlety pomocí parametrů forward scatter (FSC-H a FSC-A). Viabilita buněk byla určena pomocí Hoechst 33258 a forward scatter (FSC-A). Z živých buněk byly vytaženy CD45⁺ imunitní buňky. Z imunitních buněk byly vybrány buňky F4/80⁺, které byly považovány za makrofágy. Buňky MitoTracker Red CMXRos⁺ byly gatovány z F4/80⁺ buněk na základě FMO (fluorescence minus one) kontroly (pro přehlednost je tato gatovací strategie ukázána na příkladu sleziny). Každý orgán byl v analýze gatován dle své vlastní FMO kontroly.



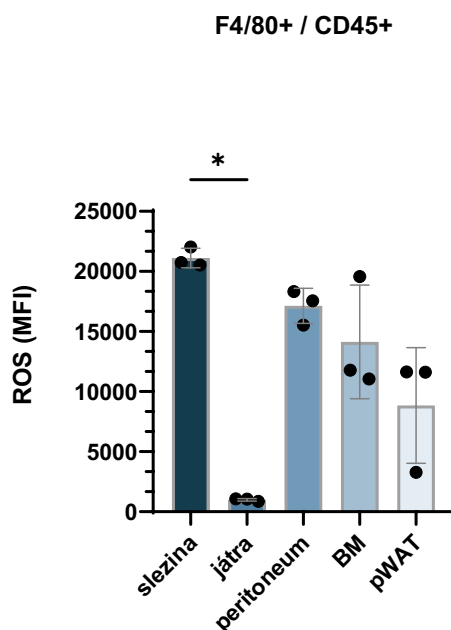
Obr. č. 6: Mitochondriální transfer do tkáňových makrofágů (F4/80+ / CD45+). Na grafech je znázorněno procentuální zastoupení MitoT⁺ buněk (F4/80+ / CD45+), neboli buněk, které přijaly mitochondrie od MSC během 1,5 hod. společné kultivace. Hodnoty vychází ze čtyř nezávisle opakováných biologických pokusů (n=4). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test. Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ a *** $p \leq 0,001$, byly označeny jako signifikantní. Zkratky: MitoT – MitoTracker Red CMXRos, BM – bone marrow (kostní dřevina), pWAT – peritoneal white adipose tissue (peritoneální bílá tuková tkáň).

5.1.1 Produkce reaktivních kyslíkových radikálů tkáňovými makrofágy

V návaznosti na data o mitotransferu do tkáňových makrofágů vzešla otázka, co by za těmito rozdíly mohlo stát. Tím, že již byla dokázána souvislost mitotransferu a ROS (Mistry et al., 2019), rozhodli jsme se produkci ROS makrofágy z jednotlivých tkání změřit pomocí FC (viz obr. č. 7). Největší tvorba ROS byla naměřena u makrofágů sleziny, peritonea a BM. Naopak nejnižší hladiny ROS produkovaly makrofágy z jater a pWAT (viz obr. č. 8).



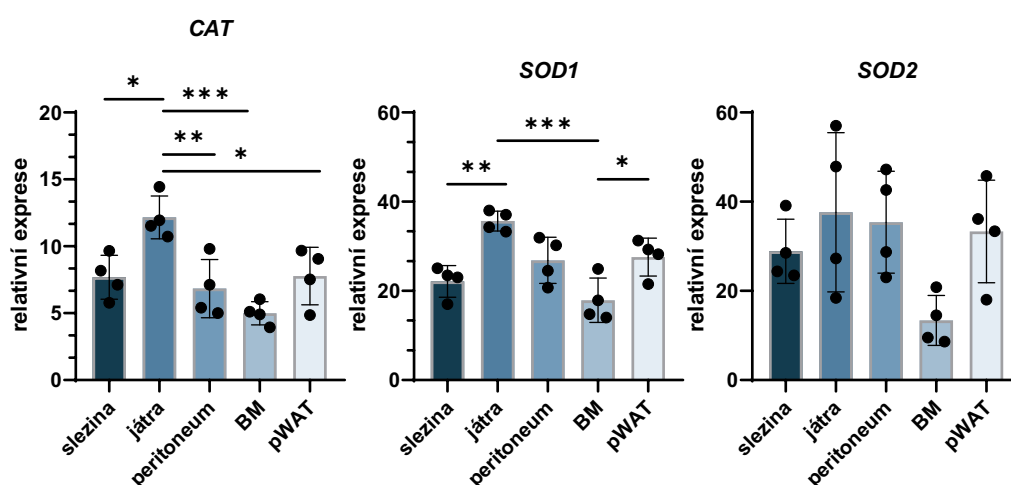
Obr. č. 7: Ukázka gatovací strategie produkce ROS tkáňovými makrofágy (F4/80⁺ / CD45⁺). Z F4/80⁺ / CD45⁺ buněk byla na zobrazení histogramu gatována pozitivita na DCFDA, marker produkce ROS. Je ukázána FMO kontrola DCFDA na vzorku jater a poté ukázkově DCFDA pozitivita pro játra a peritoneum (FMO byla provedena na peritoneálním vzorku; pro přehlednost nezobrazena).



Obr. č. 8: Produkce ROS tkáňovými makrofágy (F4/80⁺ / CD45⁺). Na grafech je znázorněna tvorba ROS tkáňovými makrofágy (detekována pomocí DCFDA) vyjádřena pomocí MFI (mean fluorescence intensity). Hodnoty vychází ze tří nezávisle opakovaných pokusů (n=3). Statistická analýza: neparametrický test (Kruskal-Wallisův test a Dunnův post-hoc test). Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky * $p \leq 0,05$, byly označeny jako signifikantní.

5.1.2 Antioxidační kapacita tkáňových makrofágů

Pro další prohloubení znalostí ohledně souvislosti produkce ROS a mitotransferu byla změřena relativní exprese genů hrajících roli v antioxidačních mechanismech buňky. Relativní exprese zvolených genů byla měřena u sortovaných tkáňových makrofágů (F4/80⁺ / CD45⁺). Nejvyšší relativní exprese genu *CAT* byla naměřena u makrofágů z jater. Velmi podobné hodnoty relativní exprese *CAT* vykazovaly další tkáň, tedy slezina, peritoneum, pWAT a nejnižší expresi měly makrofágy z BM. U genu *SOD1* byla nejvyšší exprese detekována opět u jater, relativní exprese genu *SOD1* v dalších orgánech vykazovala podobný trend, jaký byl pozorován pro gen *CAT*. Stejný trend platil i u relativní exprese genu *SOD2*, ač jsou hodnoty u jater nejednotné (viz obr. č. 9).

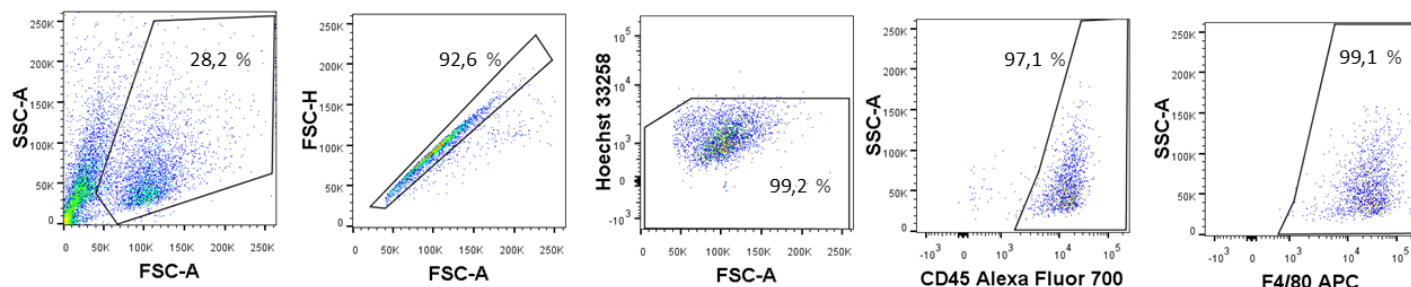


Obr. č. 9: Relativní genová exprese vybraných antioxidačních genů v tkáňových makrofázích (F4/80⁺ / CD45⁺). Hodnoty vychází ze čtyř nezávisle opakovaných biologických pokusů (n=4). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test. Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ a *** $p \leq 0,001$, byly označeny jako signifikantní.

5.2 Mitochondriální transfer do polarizovaných makrofágů (*in vitro*)

5.2.1 Diferenciace makrofágů z kostní dřeně

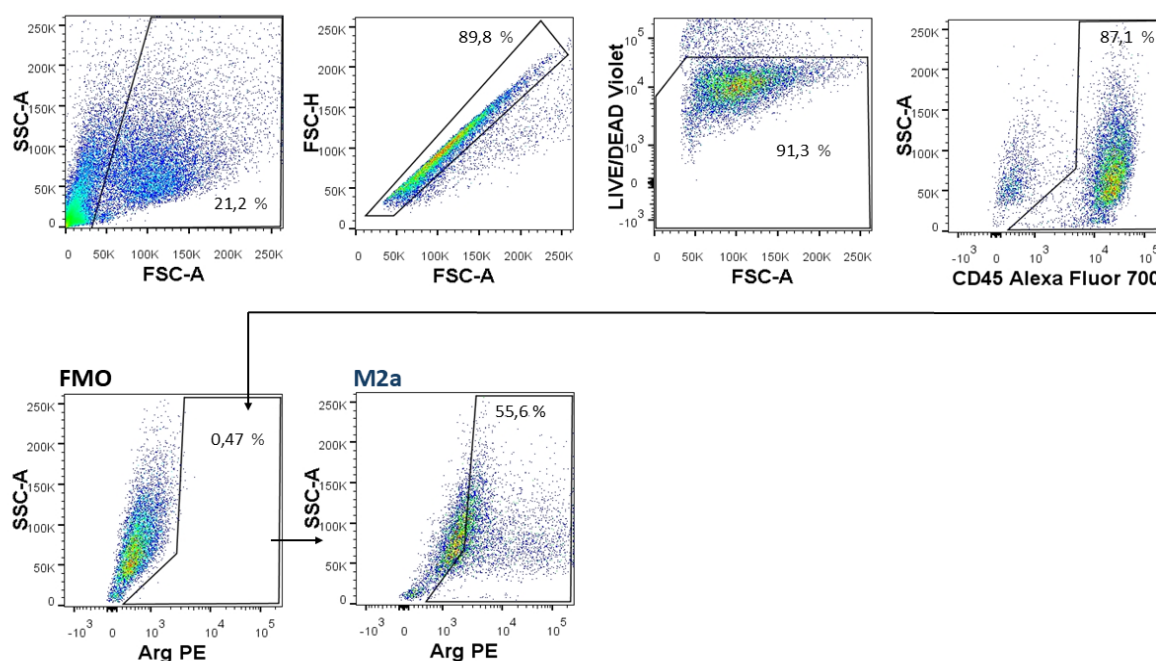
Základem experimentů v této části byly BMdM. Nejdříve bylo nutné ověřit, zda je optimalizovaný protokol pro jejich diferenciaci funkční a že doopravdy pracujeme s makrofágy. K tomuto účelu byly po týdenním diferenciálním protokolu (viz Materiály a metody, 4.8) buňky podrobeny analýze s využitím FC a určeny F4/80⁺ / CD45⁺ buňky, které byly považovány za makrofágy. Dle gatovací strategie (viz obr. č. 10) lze určit, že výtěžnost makrofágů je dle zvoleného protokolu téměř 100%. To nám umožnilo v pozdějších experimentech využívat pro určení požadovaných buněčných populací pouze znak CD45, a tím rozšířit panel o větší množství znaků.



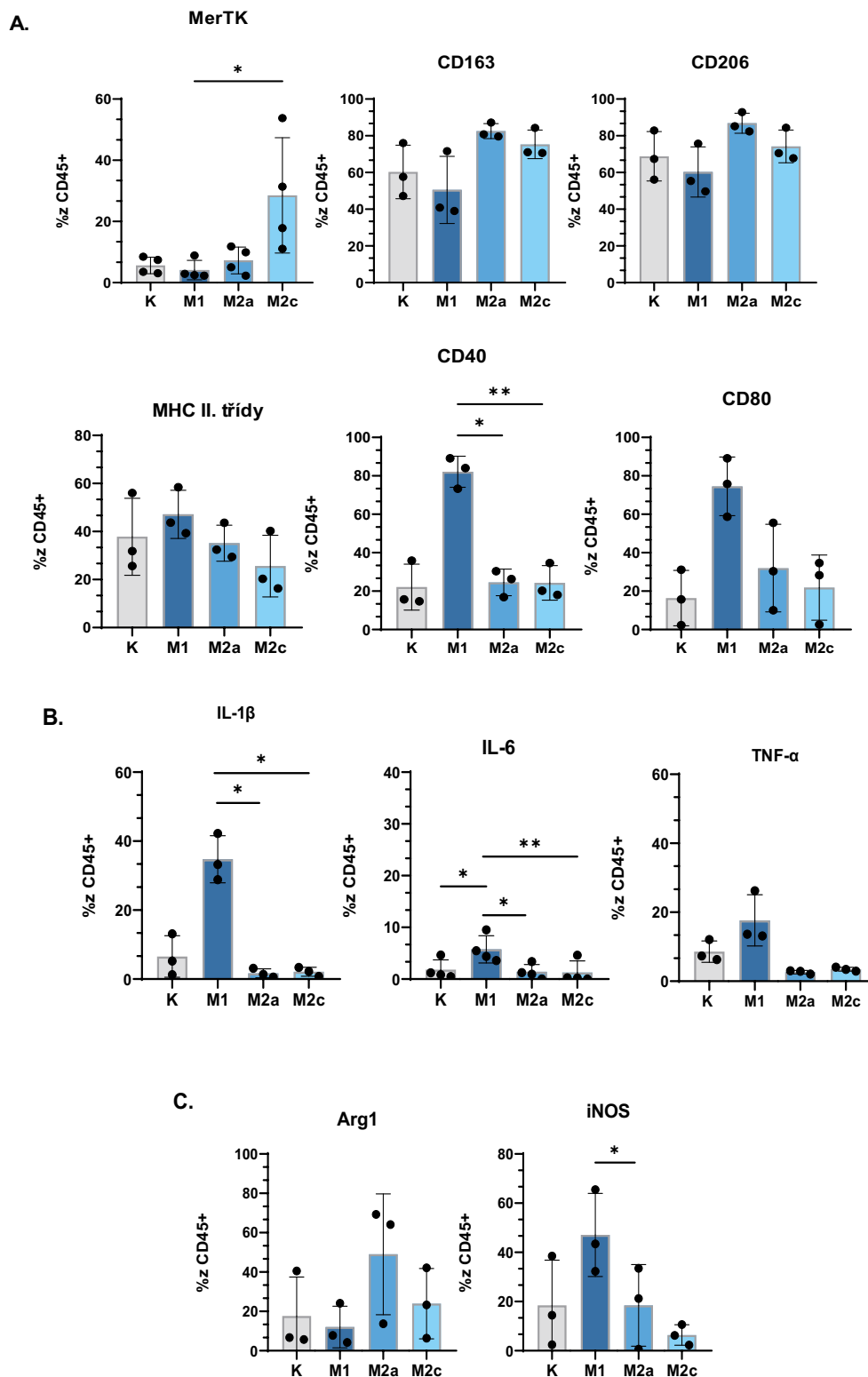
Obr. č. 10: Diferenciace makrofágů z monocytů z kostní dřeně (F4/80⁺ / CD45⁺)

5.2.2 Fenotypizace polarizovaných makrofágů

Dále bylo potřeba ověřit, zda námi zvolený protokol pro polarizaci makrofágů doopravdy dává vzniku vybraným pro- nebo protizánětlivým fenotypům (resp. stavům podobným těmto fenotypům). Po konkrétních časech působení polarizačních stimulů (viz Materiály a metody, 4.8) byly buňky fenotypizovány s využitím FC (viz obr. č. 11). Byly analyzovány jak povrchové, tak intracelulární znaky. Expresí povrchových znaků, které jsou obecně považovány za markery protizánětlivých M2 makrofágů (MerTK, CD206 a CD163), byla nejvyšší právě u M2a a M2c fenotypů. Naopak exprese znaků charakteristických svou zvýšenou expresí pro prozánětlivé M1 makrofágy (MHC II. třídy, CD40 a CD80) vykazovala vyšší hodnoty u M1 fenotypu (viz obr. č. 12, A.). Cytokiny, které jsou ve vyšších koncentracích přítomny v zánětlivém prostředí (IL-1 β , IL-6 a TNF- α), byly produkovány v nejvyšší míře M1 makrofágy. Naopak protizánětlivý TGF- β byl nejvíce produkován M2a fenotypem (viz obr. č. 12, B.). Analyzovány byly také enzymy charakteristické pro protizánětlivé a zánětlivé makrofágy. Arg1 byla exprimována nejvíce M2a fenotypem, za kterým následoval M2c fenotyp, zatímco iNOS M1 fenotypem (viz obrázek č. 12, C.).



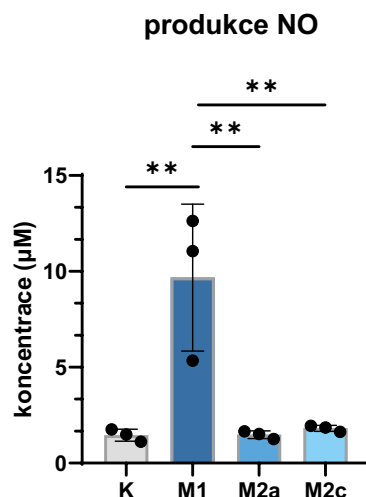
Obr. č. 11: Ukázka gatovací strategie využitá v rámci fenotypizace polarizovaných BMdM (CD45⁺) na intracelulárním znaku Arg1. Z CD45⁺ buněk byly dle FMO kontroly určeny Arg1⁺ buňky (příklad uveden na M2a fenotypu).



Obr. č. 12: Expresí znaků souvisejících s polarizací makrofágů (CD45⁺). A. Expresí vybraných povrchových znaků; B. Expresí vybraných intracelulárních znaků; C. Expresí enzymů charakteristických pro zvolené fenotypy. Hodnoty vychází ze tří až čtyř nezávisle opakovaných biologických pokusů (n=3-4). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test, nebo neparametrický test (Kruskal-Wallisův test a Dunnův post-hoc test). Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky * $p \leq 0,05$ a ** $p \leq 0,01$, byly označeny jako signifikantní. Kontrola (K) odpovídá BMdM neovlivněným polarizačními stimuly.

5.2.3 Produkce NO polarizovanými makrofágy

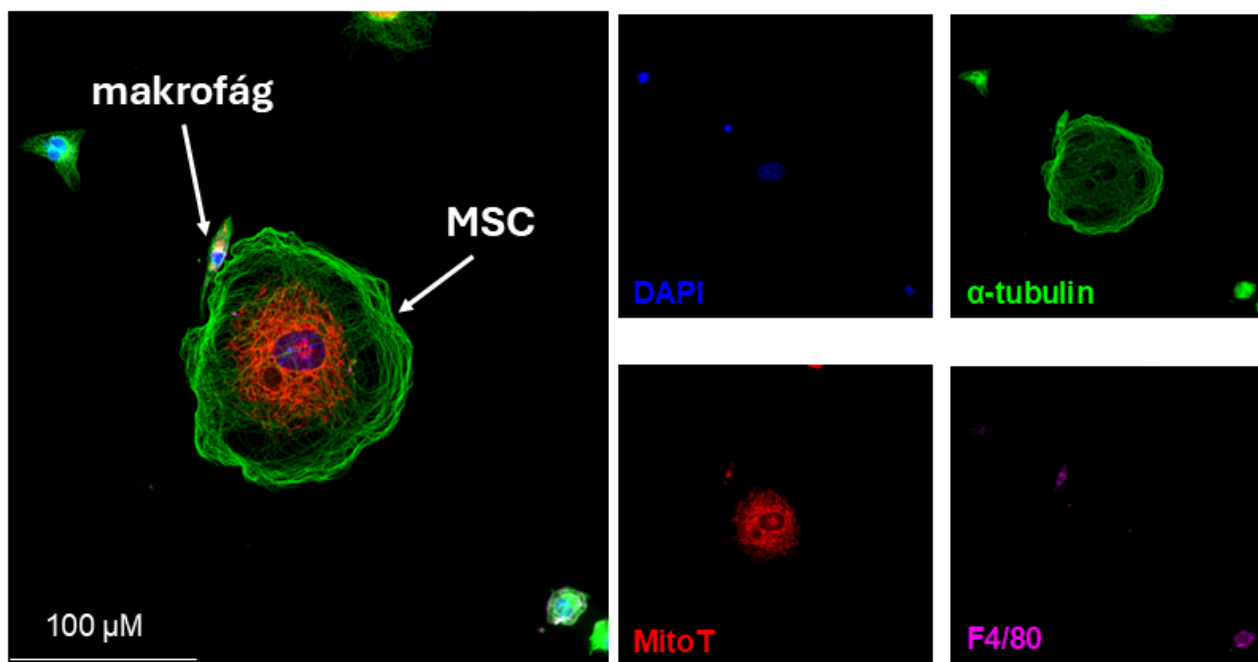
V souvislosti s fenotypizací byla naměřena také koncentrace NO, jelikož jeho produkce je jedním z efektorových mechanismů prozánětlivých M1 makrofágů. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší koncentrace NO v médiu byla u M1 makrofágů (viz obr. č. 13).



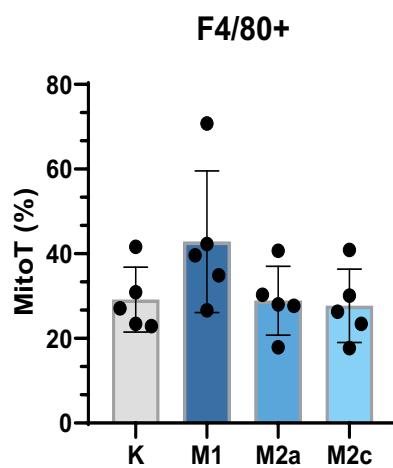
Obr. č. 13: Produkce NO polarizovanými makrofágy. Určeno Griessovou reakcí. Koncentrace NO v médiu je uvedena v µM. Hodnoty vychází ze tří nezávisle opakovaných biologických pokusů (n=3). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test. Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky $**p \leq 0,01$, byly označeny jako signifikantní. Kontrola (K) odpovídá BMdM neovlivněným polarizačními stimuly.

5.2.4 Mitochondriální transfer do polarizovaných makrofágů

Poté, co jsme ověřili, s jakými buňkami pracujeme, postoupili jsme k analýze mitotransferu. Přenos mitochondrií byl pozorován s využitím fluorescenční mikroskopie. Pozitivní červený signál (MitoTracker Red CMXRos) v makrofázích (F4/80⁺) značí, že k přenosu mitochondrií z MSC do makrofágů doopravdy došlo (viz obr. č. 14). Mitotransfer byl také měřen pomocí FC. Z dat vyplývá, že přenos mitochondrií mezi MSC a polarizovanými BMdM probíhá a že vykazuje mírně zvýšenou tendenci do M1 makrofágů v porovnání s protizánětlivými fenotypy (M2a, M2c) a kontrolou (K; nepolarizované BMdM) (viz obrázek č. 15).



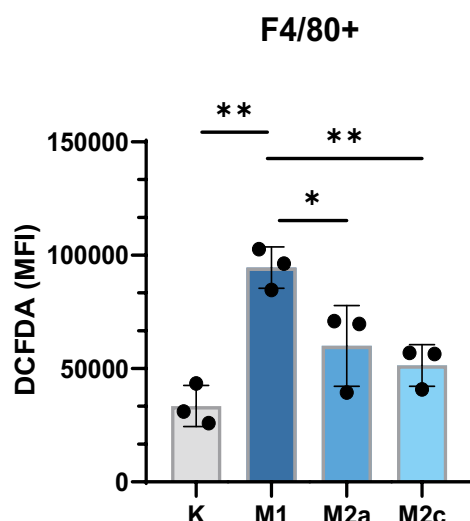
Obr. č. 14.: Fluorescenční mikroskopie mitochondriálního transferu z MSC do BMdM (F4/80⁺). BMdM byly polarizovány do M1 fenotypu. Jádra jsou značena modře (DAPI); α-tubulin zeleně; mitochondrie červeně (MitoTracker Red CMXRos; MitoT) a makrofágy magentou (F4/80). Zvětšeno 40x.



Obr. č. 15: Mitochondriální transfer do polarizovaných makrofágů (F4/80⁺). Na grafech je znázorněno procentuální zastoupení MitoT⁺ buněk (F4/80⁺; makrofágy), které přijaly mitochondrie od MSC během 1,5 hod. společné kultivace. Hodnoty vychází z pěti nezávisle opakovaných biologických pokusů (n=5). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test.

5.2.5 Produkce reaktivních kyslíkových radikálů polarizovanými makrofágy

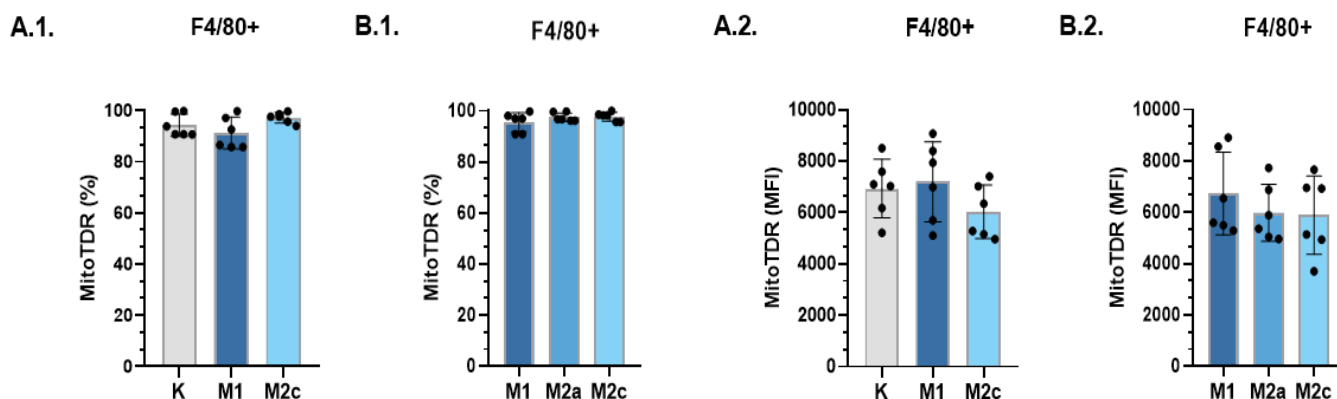
Pro ověření našeho předpokladu souvislosti mitotransferu s produkcí ROS makrofágy v první experimentální části této diplomové práce jsme se rozhodli změřit jejich produkci i u polarizovaných BMdM. Z grafu jasně vyplývá, že M1 makrofágy produkcí ROS signifikantně převyšují kontrolu (K; nepolarizované BMdM) a protizánětlivé fenotypy, což ostatně koreluje s jejich efektorovými funkcemi (viz obr. č. 16).



Obr. č. 16: Produkce ROS polarizovanými makrofágy (F4/80+). Na grafech je tvorba ROS tkáňovými makrofágy (detekována pomocí DCFDA) vyjádřena pomocí MFI. Hodnoty vychází ze tří nezávisle opakovaných biologických pokusů ($n=3$). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test. Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$, byly označeny jako signifikantní.

5.2.6 Mitochondriální transfer do různě polarizovaných makrofágů ve společné kultivaci

Pro větší biologickou relevanci byl mitotransfer z MSC analyzován i u smíšené populace složené z různě polarizovaných makrofágů (rozdělené do dvou skupin; viz Materiály a metody, tabulka č. 5; v grafech označovány jako A. /MSC + K + M1 + M2c/ a B. /MSC + M1 + M2a + M2c/). Z dat vyplývá, že došlo k významnému nárůstu mitotransferu v porovnání s mitotransferem do jednoho typu polarizovaných makrofágů (viz 5.2.4), ač byl poměr MSC vůči makrofágům zachován. Rozdíly v mitotransferu mezi jednotlivými typy polarizovaných makrofágů v rámci smíšené populace nejsou přítomny při procentuálním vyjádření (viz obr. č. 17, A.1., B.1.), mírné rozdíly jsou viditelné při vyjádření v MFI (viz obr. č. 17, A.2., B.2.).

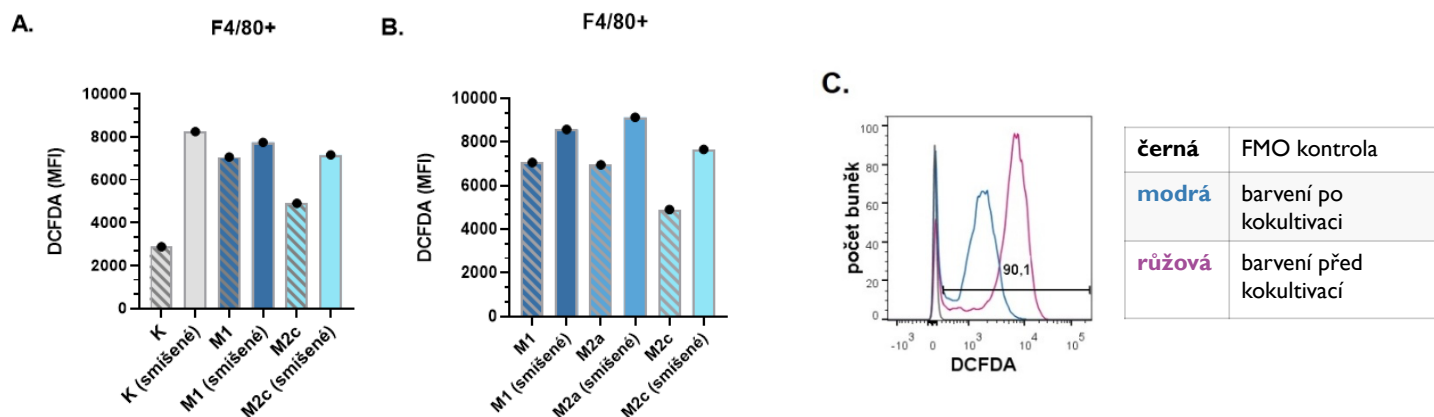


Obr. č. 17: Mitochondriální transfer do různě polarizovaných makrofágů ve společné kultivaci (F4/80+). **A.1.; B.1.** Na grafech je mitotransfer (MitoT⁺) vyjádřen procentuálně (**A.1.** – skupina obsahující kontrolu /K/, M1 a M2c; **B.1.** – skupina obsahující M1, M2a a M2c). **A.2.; B.2.** Na grafech je mitotransfer (MitoT⁺) vyjádřen pomocí MFI (**A.2.** – skupina obsahující kontrolu /K/, M1 a M2c; **B.2.** – skupina obsahující M1, M2a a M2c). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test. Hodnoty vychází z šesti nezávisle opakovaných biologických pokusů (n=6). Kontrola (K) odpovídá BMdM neovlivněným polarizačními stimuly.

5.2.7 Produkce reaktivních kyslíkových radikálů různě polarizovanými makrofágy ve společné kultivaci

Tím, že došlo k tak výraznému navýšení mitotransferu do různě polarizovaných makrofágů při jejich smíšení, bylo na místě zjistit, čím je to podmíněno. Rozhodli jsme se dále ověřit vliv ROS na mitotransfer a změřit produkci ROS. Z dat vyplývá, že makrofágy produkují signifikantně více ROS, pokud jsou kultivovány společně (smíšená populace různě polarizovaných makrofágů) (viz obr. č. 18 A., B.).

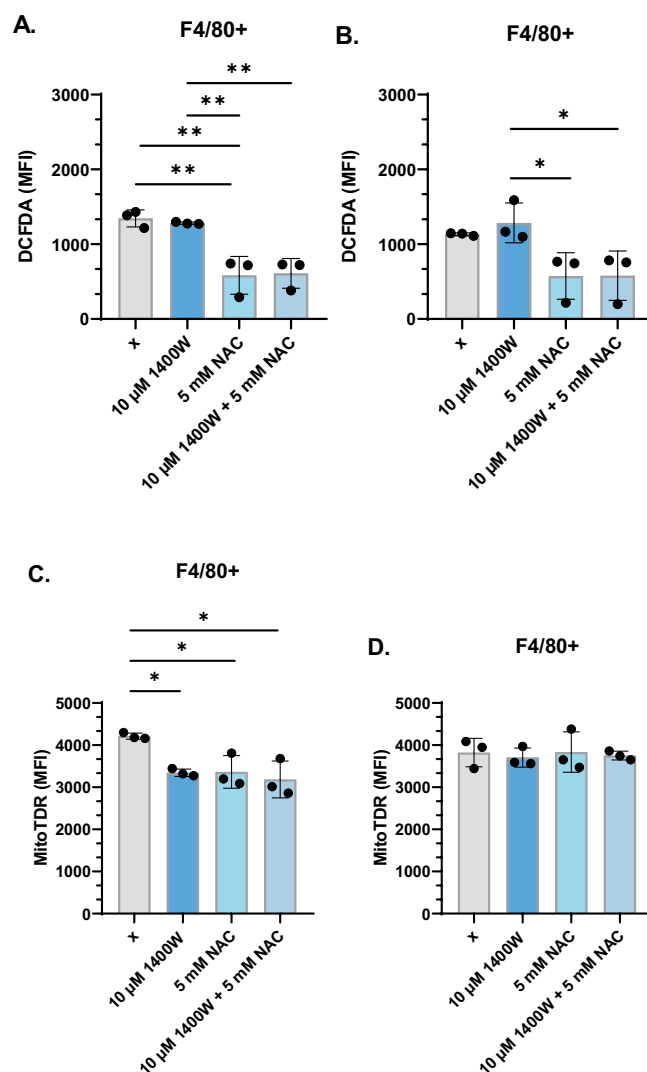
Naší hypotézou bylo, že za tím může stát způsob značení makrofágů, barvených protilátkami před společnou kultivací. Z histogramů porovnávajících produkci ROS makrofágy při barvení před kokultivací a po kokultivaci vyplývá, že zvolené barvení uměle navodilo zvýšenou tvorbu ROS, která se poté projevila i ve zvýšeném mitotransferu (viz obr. č. 18, C.). Z tohoto metodologického důvodu jsme se rozhodli nepokračovat v dalších opakováních.



Obr. č. 18: Produkce ROS ve smíšené populaci makrofágových fenotypů (F4/80+). A., B. Produkce ROS jednotlivými fenotypy (vždy první z dvojice sloupců daného fenotypu, šrafovaný sloupec) v porovnání s fenotypy ze smíšené populace (vždy druhý z dvojice sloupců daného fenotypu, sloupec bez šrafování), vyjádřeno v MFI. Hodnoty vychází z jednoho biologického opakování pokusu (n=1). C. Histogram znázorňující pozitivitu na DCFDA (značení ROS) u FMO kontroly (černá), makrofágů barvených po kokultivaci s ostatními fenotypy (modrá) a makrofágů barvených před kokultivací (růžová) s ostatními fenotypy.

5.2.8 Inhibice produkce ROS a NO makrofágy

Pro další ověření naší hypotézy souvislosti mitotransferu a produkce byla dále zvolena inhibice produkce ROS (pomocí NAC; viz Materiály a metody, 4.12) a NO (pomocí 1400W; viz Materiály a metody, 4.12) makrofágy. Z dat je zřejmé, že u kontrolních makrofágů (nepolarizované BMdM), jež byly ovlivněny NAC nebo kombinací NAC a 1400W, docházelo k signifikantnímu poklesu produkce ROS v porovnání s neovlivněnou skupinou (x) (viz obr. č. 19 A.). U M1 makrofágů je trend podobný, ač méně výrazný (viz obr. č. 19 B.). Pokud se podíváme na mitotransfer, u kontrolních makrofágů (nepolarizované BMdM) došlo k mírnému poklesu u inhibovaných vzorků oproti neovlivněné skupině (x), a to bez rozdílů mezi jednotlivými inhibicemi nebo jejich kombinací (viz obr. č. 19 C.). U M1 makrofágů nebyly patrné rozdíly (viz obr. č. 19 D.).



Obr. č. 19: Inhibice produkce ROS a NO makrofágy v kultivaci s MSC (F4/80⁺). **A.** Produkce ROS kontrolními makrofágy (nepolarizované BMdM) vyjádřena v MFI. **B.** Produkce ROS M1 makrofágy vyjádřena v MFI. **C.** Procentuální zastoupení MitoT⁺ kontrolních makrofágů (nepolarizované BMdM), které dostaly mitochondrie od MSC v rámci kokultivace. **D.** Procentuální zastoupení MitoT⁺ M1 makrofágů, které dostaly mitochondrie od MSC v rámci společné kultivace. Hodnoty vychází ze tří nezávisle opakovaných biologických pokusů (n=3). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test. Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, byly označeny jako signifikantní. Skupina bez ovlivnění je značena „x“.

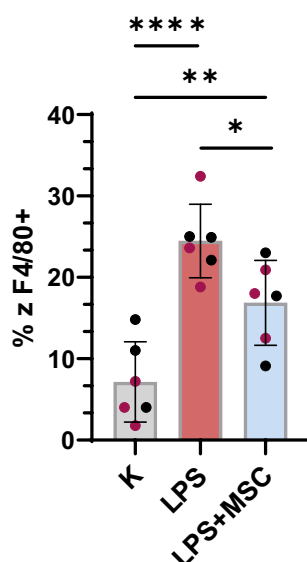
5.3 Mitochondriální transfer v *in vivo* modelu

Pro rozšíření poznatků, které byly získány v rámci *in vitro* části, byly provedeny *in vivo* experimenty. Při nich bylo pracováno s transgenním myším modelem *mito::mKate2* (viz Materiály a metody, 4.1 a 4.13).

5.3.1 Infiltrace makrofágů

Pro potvrzení navození akutního zánětu v našem modelu, byla provedena analýza infiltrace makrofágů do postižených orgánů. Z grafů vyplývá, že 48 hodin po injekci LPS do peritoneální dutiny, došlo k signifikantnímu navýšení počtu makrofágů v játrech v porovnání s kontrolou (K). Po aplikaci MSC došlo k poklesu infiltrace makrofágů (viz obr. č. 20) v porovnání se zánětlivou skupinou.

infiltrace F4/80+ / CD45+ buněk do jater

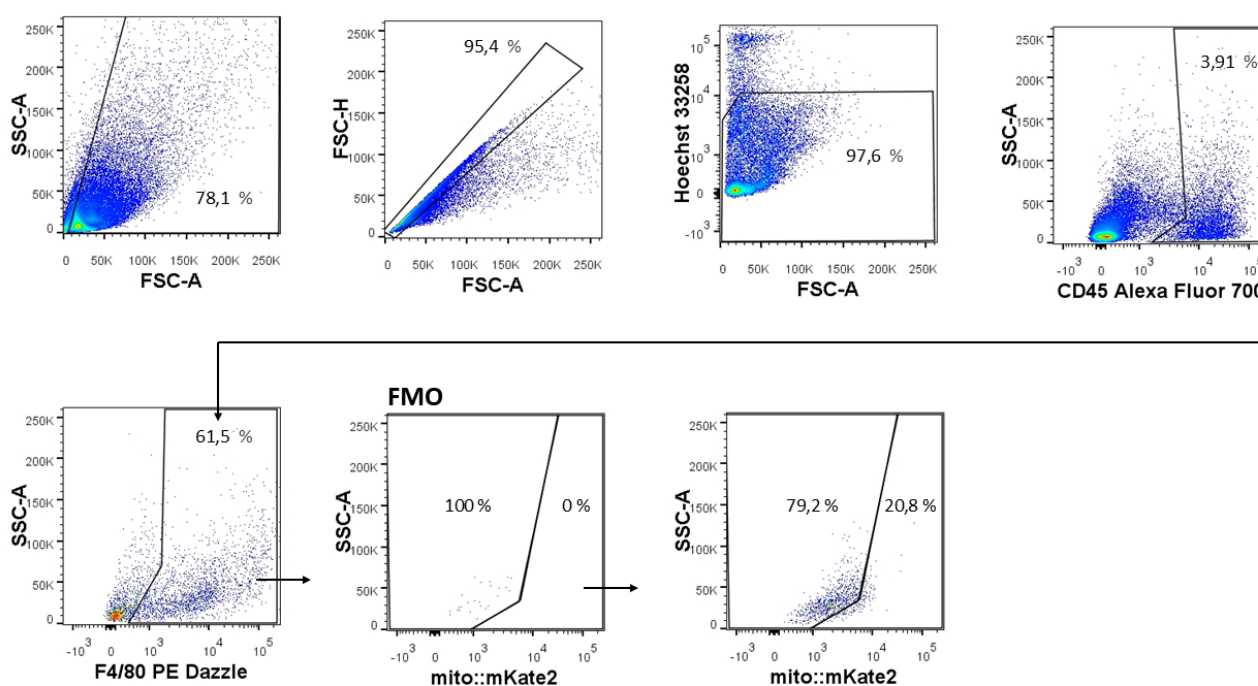


Obr. č. 20: Infiltrace makrofágů (F4/80⁺ / CD45⁺) do jater. Graf znázorňuje procentuální zastoupení makrofágů v kontrolních játrech (K), v játrech ve skupině s navozeným zánětem (LPS) a v játrech ve skupině, u které byly podány MSC (LPS+MSC). Hodnoty vychází ze dvou nezávisle opakovaných pokusů (od sebe odlišeny barevně) a šesti biologických opakování (n=6). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test. Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$, byly označeny jako signifikantní.

5.3.2 Mitochondriální transfer v *in vivo* modelu

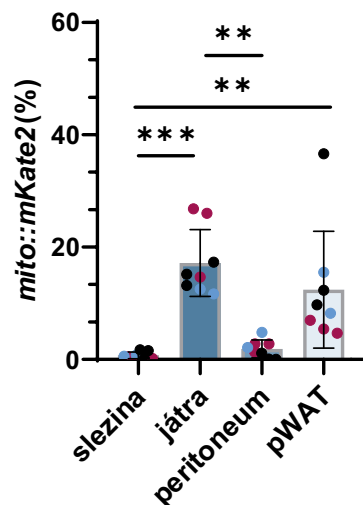
Mitotransfer byl zkoumán u skupiny LPS+MSC (tedy myši, kterým byly po navození akutního zánětu injikovány MSC). Zajímal nás přenos mitochondrií v oblastech souvisejících s peritoneální dutinou, konkrétně v samotné dutině, pWAT a slezině. Ukázková gatovací strategie je uvedena na obr. č. 21 na příkladu pWAT. Nejvyšší mitotransfer byl pozorován do makrofágů v játrech a pWAT. Naopak mitotransfer v peritoneu byl signifikantně nižší a ve slezině téměř nulový (viz obr. č. 22).

Protože jsme u prvních opakování viděli opakující se trend nejvyššího mitotransferu do jater, rozhodli jsme se provést mikroskopii na jaterních řezech. MSC byly před intraperitoneálním podáním obarveny MitoTrackerem Red CMXRos (funkční mitochondrie) a CFSE (značení živých MSC). Z mikroskopického obrázku řezem jater je díky pozitivnímu signálu na CFSE (značení živých MSC) zřejmá přítomnost živých MSC v játrech po jejich intraperitoneální injikaci. Pozitivní červený signál (MitoTracker Red CMXRos) mimo MSC značí, že nejspíše došlo k mitotransferu do buněk jater (viz obr. č. 23).

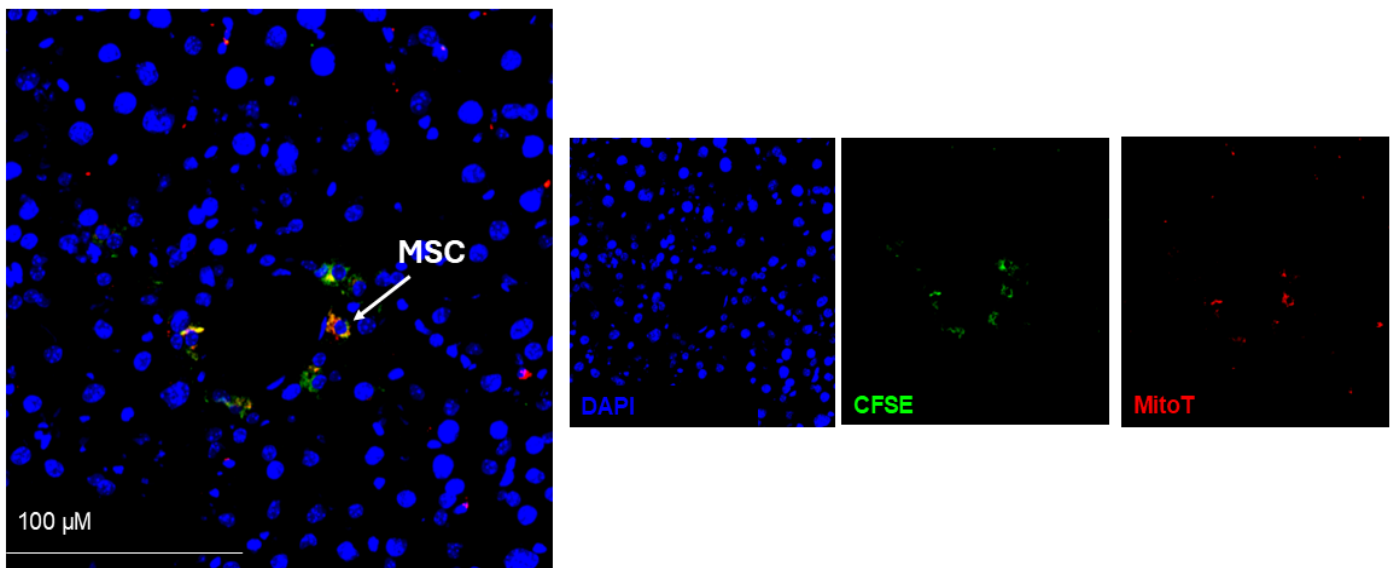


Obr. č. 21: Ukázka gatovací strategie mitochondriálního transferu do makrofágů pWAT ($F4/80^+$ / $CD45^+$) v *in vivo* modelu. Z $F4/80^+$ (makrofágy) buněk byly dle FMO kontroly gatovány $mito::mKate2^+$. Byly gatovány také $mito::mKate2^-$ buňky. Gatovací strategie je ukázána na vzorcích pWAT.

F4/80+ / CD45+



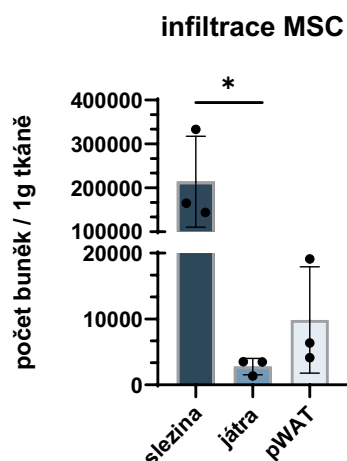
Obr. č. 22: Mitochondriální transfer z MSC do tkáňových makrofágů (F4/80+ / CD45+) v in vivo modelu. Na grafech je znázorněno procentuální zastoupení mito::mKate2+ buněk (F4/80+ / CD45+; makrofágy), které dostaly mitochondrie od MSC v in vivo modelu. Hodnoty vychází ze tří nezávisle opakovaných pokusů (od sebe odlišeny barevně) a osmi biologických opakování (n=8). Statistická analýza: neparametrický test (Kruskal-Wallisův test a Dunnův post-hoc test). Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,00$, byly označeny jako signifikantní.



Obr. č. 23: Fluorescenční mikroskopie mitochondriálního transferu z MSC v řezu játry (5 μm) z in vivo modelu. MSC byly před injekcí do myši značeny CFSE (značení živých MSC; zelená) a MitoTracker Red (funkční mitochondrie; červená). Jádra byla na řezech značena DAPI (modrá). Zvětšeno 20x.

5.3.3 Infiltrace MSC do tkání souvisejících s peritoneální dutinou

Naším cílem v závěru této experimentální části bylo zjistit, kam MSC migrují po jejich intraperitoneálním podání. MSC byly detekovány pomocí značení $CD45^-/CD73^+/mito::mKate2^+$. Z dat je zřejmé, že nejvíce MSC bylo zachyceno ve slezině, a to se statisticky významným rozdílem vůči játrům. Naopak v pWAT a játrech bylo MSC nejméně (viz obr. č. 24).

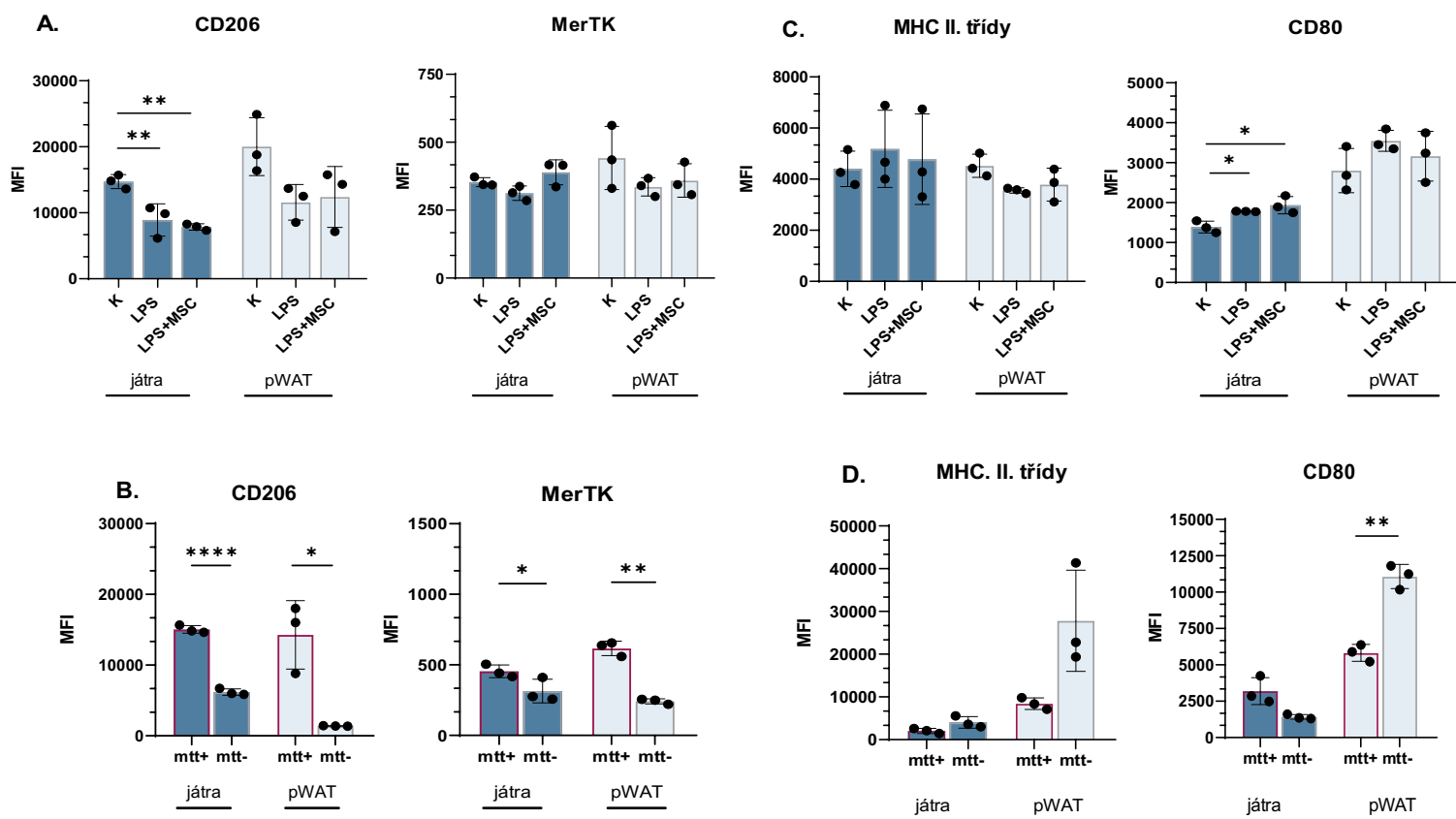


Obr. č. 24: Infiltrace MSC ($CD45^-/CD73^+/mito::mKate2^+$) do tkání související s peritoneální dutinou. Hodnoty jsou vyjádřeny jako absolutní počty buněk na 1 gram dané tkáně. Hodnoty vychází z jednoho experimentu a třech biologických opakováních ($n=3$). Statistická analýza: neparametrický test (Kruskal-Wallisův test a Dunnův post-hoc test). Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky $*p \leq 0,05$, byly označeny jako signifikantní.

5.3.4 Exprese vybraných znaků makrofágy v *in vivo* modelu

Pro zjištění dopadu navozeného akutního zánětu a samotného mitotransferu na makrofágy, byly změřeny jejich vybrané znaky u jater a pWAT (z důvodu nejvyššího mitotransferu do těchto tkání). Jednalo se o znaky související s jejich pro- nebo protizánětlivým charakterem. U CD206 je patrné, že došlo k poklesu exprese po navození zánětu (LPS) v porovnání s kontrolou (K). Po aplikaci MSC nedošlo k signifikantním změnám u jater a ani pWAT. Exprese MerTK nevykazovala statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami u jater ani u pWAT (viz obr. č. 25 A.). Dále byla porovnávána exprese těchto protizánětlivých znaků u makrofágů, jež přijaly mitochondrie od MSC (mtt^+) a těch, které nikoliv (mtt^-). Byly zřejmé signifikantní rozdíly v obou znacích s vyšší expresí u mtt^+ makrofágů (viz obr. č. 25 B.). Dále nás zajímala exprese MHC II. třídy a CD80, u kterých nebyly pozorovány výraznější rozdíly mezi jednotlivými skupinami (K, LPS, LPS+MSC) u obou orgánů. U mtt^+ a mtt^- byly u exprese MHC II. třídy patrné rozdíly, avšak ne signifikantní (viz

obr. č. 25 C.). Expres CD80 statisticky signifikantní rozdíly mezi mtt^+ a mtt^- vykazovala, avšak trendy jsou u orgánů opačné. Jaterní makrofágy, které dostaly mitochondrie, vykazovaly nižší zastoupení CD80 na svém povrchu, zatímco u pWAT lze pozorovat opačný trend (viz obr. č. 25 D.).



Obr. č. 25: Expres vybraných znaků makrofágy ($F4/80^+$ / $CD45^+$) v *in vivo* modelu. Hodnoty jsou vyjádřeny v MFI daného znaku. **A.** Expres CD206 a MerTK makrofágy v kontrolní skupině (K), skupině, u které byl navozen zánět (LPS) a skupině, které byly, po indukci zánětu, podány MSC (LPS+MSC). **B.** Expres CD206 a MerTK makrofágy, které obdržely mitochondrie od MSC (mtt^+ , tedy $mito::mKate2^+$) a makrofágy, které je neobdržely (mtt^- , tedy $mito::mKate2^-$). **C.** Expres MHC II. třídy a CD80 makrofágy v kontrolní skupině (K), skupině, které byl podán LPS (LPS) a skupině, které byly podány MSC (LPS+MSC). **D.** Expres MHC II. třídy a CD80 makrofágy, které obdržely mitochondrie od MSC (mtt^+ , tedy $mito::mKate2^+$) a makrofágy, které je neobdržely (mtt^- , tedy $mito::mKate2^-$). Hodnoty vychází z jednoho experimentu a třech biologických opakováních ($n=3$). Statistická analýza: jednosměrná ANOVA, Tukeyho test, nebo párový *t*-test. Hodnoty, které vykazovaly statistické odchylky $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,0001$, byly označeny jako signifikantní.

6. Diskuse

MSC jsou známé pro své regenerativní a imunomodulační účinky, které jsou zprostředkovány řadou mechanismů. Jedním z těchto mechanismů je i mitotransfer do různých buněčných typů, včetně těch imunitních. Působení MSC na imunitní buňky má typicky protizánětlivý účinek (shrnutí v: Planat-Benard et al., 2021). Jedním z recipientních buněčných typů jsou i makrofágy, důležití hráči v homeostáze i zánětu. Dle dosud dostupné literatury je zřejmé, že mitotransfer z MSC do makrofágů vede k podpoře jejich polarizace do M2 protizánětlivých fenotypů, a s tím i souvisejících efektorových funkcí (Jackson et al., 2016; Yuan et al., 2021). Poznatky v oblasti jak samotného mitotransferu, tak konkrétně přenosu mezi MSC a makrofágy, zůstávají velmi omezené. O faktorech, které mitotransfer podmiňují či regulují, se ví stále velmi málo. Je ale zřejmé, že se jedná o další významný mechanismus, kterým MSC komunikují v rámci svého mikroprostředí. S ohledem na tuto skutečnost je tedy na místě věnovat tomuto fenoménu další výzkum s cílem odhalit stěžejní body jeho regulace, a tím se přiblížit jeho terapeutickému využití. Tato diplomová práce si kladla za cíl blíže charakterizovat mitotransfer z MSC do makrofágů izolovaných z různých tkání a do makrofágů vystaveným různým polarizačním stimulům *in vitro*. Za účelem provedení *in vitro* části byly využity kultivační experimenty. Pro dosažení větší biologické relevance byl využit *in vivo* transgenní myší model *mito::mKate2*.

První část byla věnována mitochondriálnímu transferu do tkáňových makrofágů v *in vitro* podmínkách (viz Výsledky, 5.1). Dostupné *in vitro* studie ukazují, že mitotransfer je procesem probíhajícím v různorodých tkáních, a to za fyziologických i patologických podmínek (Sinclair et al., 2016). Většina dosavadních studií byla prováděna především na modelech patologií daných tkání. My jsme se zaměřili na mitotransfer do tkáňových makrofágů za fyziologických podmínek. Zvolené tkáně či orgány představují místa relevantní k imunologickým či metabolickým dějům. Umožnily nám zkoumat mitotransfer v různých prostředích, a získat tak cenná data k následnému porovnání. Pomocí FC jsme prokázali, že mitotransfer probíhal do makrofágů ve všech námi zvolených tkáních. To odpovídá pozorováním, ve kterých je mitotransfer popsán jako součást fyziologických mechanismů podílejících se na tkáňové homeostáze a vývoji (Acquistapace et al., 2011). Mitotransfer se významně lišil mezi jednotlivými orgány s výrazně nižším přenosem do jater a pWAT oproti slezině, BM a peritoneu.

Současně dostupné studie se doposud nezaměřovaly na porovnání preference mitotransferu z MSC do makrofágů mezi jednotlivými tkáněmi. Je ale předpokládáno, že preference mitotransferu bude ovlivněna různorodými faktory. Tím, že již byla dokázána spojitost mezi zvýšenou produkcí ROS, jako formy buněčného stresu, a iniciací mitotransferu

(Mistry et al., 2019), rozhodli jsme se změřit produkci ROS tkáňovými makrofágy. Nejvyšší produkce ROS byla zaznamenána u makrofágů sleziny, BM a peritonea, zatímco makrofágy izolované z jater a pWAT vykazovaly nejnižší produkci. Možné zkreslení vlivem izolačních postupů bylo minimalizováno kultivací buněk po dobu 24 hodin po jejich izolaci. Tato pozorování nás dovedla k úvaze, která dávala do souvislosti produkci ROS makrofágy a preferenci či míru mitotransferu z MSC.

Studií, které by se specificky zabývaly ROS jako faktorem ovlivňujícím mitotransfer, je výrazný nedostatek. Pokud takové existují, typicky se zabývají mitotransferem v myších modelech patologií, kdy je zvýšená produkce ROS průvodním jevem narušení homeostázy (Marlein et al., 2017; Mistry et al., 2019). V našem fyziologickém nastavení bylo na místě hledat novou spojitost. Játra jsou centrem řady metabolických pochodů, včetně těch, které stojí za detoxifikací molekul endogenní i exogenní povahy. Přirozeně se jedná o orgán s vysokou antioxidační kapacitou, tedy i významným zastoupením antioxidačních enzymů. Na základě této počáteční úvahy jsme se rozhodli změřit relativní expresi tří vybraných genů, jejichž produkty představují enzymy podílející se na antioxidačních procesech buňky. Konkrétně se jednalo o katalázu (*CAT*; rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu), superoxid dismutázu 1 (*SOD1*; přeměna superoxidu na peroxid vodíku a kyslík v rámci cytoplazmy) a superoxid dismutázu 2 (*SOD2*; přeměna superoxidu na peroxid vodíku a kyslík v rámci mitochondrií). Autoři publikace, ve které byla provedena komplexní analýza transkriptomu stovky antioxidačních enzymů několika myších orgánů (kmen BALB/c) (Kim et al., 2018), vyhodnotili játra jako orgán s obecnou nejvyšší antioxidační kapacitou, což v diskusi korelovali s jejich funkcemi. Naopak slezinu, tedy sekundární lymfoidní orgán, vyhodnotila jako orgán s obecnou nízkou aktivitou těchto enzymů. Tato publikace se zaměřila na některé z genů i v rámci analýzy s využitím qPCR, tedy metody, kterou jsme využívali i my. Námi získaná data relativní exprese *CAT* a *SOD1* potvrdila naše předpoklady a ukázala se jako nejvyšší u jater, což ostatně souhlasí i se zmíněnou publikací. Další orgány mezi sebou významné rozdíly nevykazovaly, ale makrofágy BM měly v obou genech nejnižší relativní expresi. U *SOD2* byly výsledky z jednotlivých opakování nejednotné. Je důležité uvést, že zmiňovaná publikace pracuje se všemi buňkami izolovanými z dané tkáně, zatímco relativní exprese těchto genů byla v naší analýze určena pouze u makrofágů. Jak v případě citované studie, tak naší analýzy, se jednalo o nastavení mimikující fyziologické podmínky, tedy bez přítomnosti zánětu. Tím, že makrofágy, především ty rezidentní, mají podstatný podíl na udržování homeostázy dané tkáně, mohly by svým charakterem odrážet celkovou fyziologickou funkci daného orgánu či tkáně v organismu.

Po vyhodnocení dat týkajících se mitotransferu z MSC do tkáňových makrofágů, produkce ROS a relativní exprese antioxidačních enzymů v tkáňových makrofázích, jsme

formovali hypotézu souvislosti míry produkce ROS makrofágy a preferencí mitotransferu ze strany MSC. Úvaha byla taková, že čím více jsou makrofágem produkovány ROS, tím větší je šance, že obdrží mitochondrie od MSC, resp. tím vyšší bude míra mitotransferu. Tato teze dává logický smysl, jelikož zvýšená produkce ROS je typicky spojena s celkovým buněčným stresem. Tento stres mohou vyvolávat různé podněty, včetně dysfunkce samotných mitochondrií. Nespočet studií ukázal, že přijetí funkčních mitochondrií recipientní buňkou s určitým mitochondriálním poškozením působí antiapoptoticky a napomáhá navrátit mitochondriální membránový potenciál (Han et al., 2016; Yao et al., 2018). V literatuře již bylo nastíněno, že MSC jsou schopné reagovat na mitochondrie uvolňované z poškozených buněk a pohlcovat je. Pohlcení defektních mitochondrií podporuje mitochondriální biogenezi v MSC, což sekundárně vede ke zvýšené schopnosti předávat zdravé mitochondrie (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Zvýšené hladiny ROS by tedy byly ze strany recipientní buňky jakýmsi signálem nebezpečí pro buňku donorovou k předání mitochondrií. Naše data naznačují, že ROS by potenciálně mohly být regulačním faktorem mitotransferu i za fyziologických podmínek. Tkáně, které mají přirozeně omezenou antioxidační kapacitu, by mohly být více energeticky a regeneračně podporovány skrze mitotransfer. Výsledky z qPCR ale nelze jednoznačně korelovat s výsledky mitotransferu. ROS tedy nepochybně nepředstavují jediný faktor uplatňující se při regulaci transferu mitochondrií.

Navazující část této práce řešila téma mitochondriálního transferu do polarizovaných makrofágů (viz Výsledky, 5.2). V našem projektu bylo důležité zohlednit současný pohled vědecké komunity na problematiku makrofágové polarizace, které výrazně překonává klasické M1 a M2 rozdělení. Fenotypy, které makrofágy zaujímají svou polarizací, jsou dynamické a neustále se měnící. V experimentální praxi tak nelze získat přesně definované fenotypy, spíše tzv. „phenotype-like“ makrofágy (shrnutí v: Strizova et al., 2023). Poté, co jsme ověřili čistotu populace makrofágů získaných diferenciací z BM, přistoupili jsme k fenotypizaci takto získaných buněk po jejich ovlivnění různými polarizačními stimuly. Naším cílem bylo získat makrofágy, které by se co nejvíce přibližovaly M1 prozánětlivému fenotypu a M2 protizánětlivému fenotypu. Ze získaných dat vyplývá, že znaky, které jsou obecně považované za protizánětlivé, byly nejvíce exprimovány právě M2a a M2c makrofágy. Na druhé straně znaky, jejichž zvýšené exprese jsou spojovány s prozánětlivými makrofágy, byly skutečně navýšeny po polarizaci do M1. Další metodou sloužící k charakterizaci polarizovaných makrofágů byla Griessova reakce, která potvrdila, že M1 makrofágy produkují nejvyšší koncentrace NO, což koreluje s efektorovou funkcí NO v zánětu. Výsledky ukazují, že rozdíly v expresi mezi M1 a M2 fenotypy v mnoha případech nejsou signifikantní. To je dáno několika faktory. Za prvé, jak již bylo zmíněno, makrofágy se mohou nacházet v širokém spektru fenotypových stavů, tudíž ani jejich markery nelze rozdělovat na striktně pro- a protizánětlivé.

Dalším prvkem, který mohl ovlivnit expresi znaků, byl růstový faktor využitý pro diferenciaci makrofágů. M-CSF se využívá v praxi k získání makrofágů z monocytů z kostní dřeně. Jeho použití ale samo o sobě nevede pouze k diferenciaci makrofágů, ale i k podpoře jejich polarizace do M2 fenotypu (Mia et al., 2014). Tato výchozí orientace BMdM do M2 fenotypu mohla potenciálně zkomplikovat účinnost polarizace do M1 fenotypu. Na druhou stranu, užití M-CSF v protokolu bylo opodstatněné, jelikož pokud bychom k diferenciaci využili GM-CSF, došlo by naopak k orientaci směrem k M1 fenotypu (Mia et al., 2014). Je také vhodné vzít v úvahu, že výběr myšího kmene BALB/c, se kterým bylo pracováno v rámci celého projektu, s sebou přináší obecné Th2 nastavení jejich imunitního systému (Watanabe et al., 2004). Tato skutečnost by také mohla přispívat k přirozené orientaci BMdM k M2 fenotypu. Náš protokol pro polarizaci makrofágů nám umožnil se přiblížit k požadovaným M1 a M2 fenotypům, a získat tak „phenotype-like“ makrofágové stavy.

Po fenotypizaci, která nám pomohla určit, s jakými buňkami pracujeme, jsme se zaměřili na mitotransfer z MSC do polarizovaných makrofágů, který byl pozorován pomocí fluorescenční mikroskopie a následně měřen s využitím FC. Fluorescenční mikroskopie, na základě pozitivního červeného signálu v makrofázích (MitoTracker Red CMXRos), potvrdila, že mitotransfer mezi MSC a BMdM doopravdy probíhal. Charakterizace struktur využitých pro přenos mezi MSC a makrofágy nebyla předmětem zájmu. V přenosu mitochondrií nebyly signifikantní rozdíly mezi jednotlivými polarizovanými makrofágy. Mírně zvýšenou tendenci v předávání mitochondrií z MSC lze pozorovat u M1 fenotypu.

V souladu s předchozími výsledky i zde jsme se rozhodli dále rozvíjet naši hypotézu souvislosti ROS a mitotransferu. U polarizovaných makrofágů byla změřena produkce ROS, přičemž nejvyšší schopnost jejich tvorby byla detekována u M1 makrofágů. Tyto rozdíly byly očekávatelné vzhledem k tomu, že produkce ROS je jedním z dalších efektorových mechanismů makrofágů v zánětlivém prostředí (shrnuje Strizova et al., 2023). Je tedy patrné, že v případě BMdM zvýšená produkce ROS M1 makrofágy nevede k podpoře mitotransferu od MSC, tak jak bylo předpokládáno u tkáňových makrofágů. Za tím může stát několik skutečností. V první řadě, BMdM byly v našem experimentálním nastavení získávány *in vitro* působením M-CSF na buněčnou suspenzi získanou z BM, zatímco tkáňové makrofágy byly izolované z tkání a nebyla prováděna jejich další diferenciaci. Velký podíl makrofágů izolovaných z tkání tvoří TRM, tedy ty, které danou tkáň osidlují prenatálně a za fyziologických podmínek tvoří sebe obnovující se populace. TRM se přirozeně vyskytují především v M2 fenotypu, tedy takovém, který se primárně podílí na udržování homeostázy konkrétní tkáně (shrnuje Lee & Sacks, 2024). Důvodem odlišné míry mitotransferu by mohl být odlišný původ a nastavení TRM a BMdM. TRM mají navíc určitý kontext mikroprostředí, který vnáší další stupeň jejich heterogenity. Naproti tomu BMdM vznikají umělou diferenciací *in vitro* bez širokého spektra stimulů

pocházejících tkáňového mikroprostředí. Díky BMdM získáváme sice lépe definované stavy podobné určitým fenotypům, avšak s nedostatečnou relevancí ke komplexitě živého organismu. Je tedy pravděpodobné, že v těchto dvou nastaveních mohou dominovat odlišné faktory regulující mitotransfer.

Pro větší relevanci k podmínkám *in vivo* byl následně zkoumán mitotransfer z MSC do smíšené populace různě polarizovaných makrofágů. Z dat vyplývá, že došlo k výraznému navýšení mitotransferu v porovnání s daty, která zobrazují mitotransfer do populace tvořené makrofágy polarizovanými jedním typem stimulu (tj. buď M1, nebo M2a, nebo M2c, viz Výsledky, 5.2.4 v porovnání s 5.2.6). Rozdíly v mitotransferu mezi jednotlivými typy polarizovaných makrofágů ve smíšené populaci nebyly patrné. Pozorované navýšení mitotransferu při smíšení jednotlivých typů polarizovaných makrofágů vyžadovalo hlubší analýzu. Na základě předešlých dat a zavedené hypotézy souvislosti ROS a mitotransferu jsme pokračovali detekcí produkce ROS jednotlivými typy polarizovaných makrofágů ve smíšené populaci. Je patrné, že při společné kultivaci různě polarizovaných makrofágů došlo k významnému navýšení produkce ROS v porovnání s jejich tvorbou jednotlivými fenotypy v samostatných kultivacích. Tyto výsledky přinesly určité pochybnosti ohledně metodologie barvení. Z tohoto důvodu jsme zkusili porovnat produkci ROS makrofágy, které byly barveny po společné kultivaci, s těmi, které byly barveny ještě před kokultivací (postup v barvení použit v této experimentální části). Bylo zjištěno, že u makrofágů barvených před společnou kultivací dochází k enormnímu nárůstu produkce ROS, v porovnání s těmi, které byly barveny až po kultivaci před samotnou analýzou. Jednou z příčin tohoto navýšení ROS mohla být aktivace makrofágů skrze jejich Fc receptory, které reagovaly na Fc části mAb navázaných na makrofázích v jejich okolí při kultivaci. Podmínky kultivace, která probíhala po dobu 90 minut v teplotě 37 °C, mohly aktivaci výrazně podpořit. Signalizace skrze Fc receptory může vést mimo jiné k podpoře oxidativního vzplanutí aktivací NADPH oxidázy (shrnutí v: Taylor & Tse, 2021). Pravděpodobně tedy došlo k arteficiální indukci buněčného stresu doprovázeného zvýšenými hladinami ROS, které se promítly do zvýšeného mitotransferu. Metodologie barvení by se tedy dala do budoucna optimalizovat přidáním blokačních protilátek proti Fc receptorům (konkrétně např. anti-mouse CD16/CD32 protilátka) pro zabránění nespecifické aktivace buněk. Další možností by mohl být jiný způsob značení polarizovaných makrofágů k odlišení jednotlivých fenotypů v kultuře. K tomuto účelu by se daly použít odlišné koncentrace fluorescenčních barev CFSE a CPDI (Lyons, 2000; Vasimalla et al., 2017). Tím, že se tato barviva navazují přímo na komponenty uvnitř buňky (na aminy v cytoplazmě, nebo DNA), nevedlo by jejich užití k nespecifické aktivaci Fc receptorů. Kromě toho by barvení koncentrační řadou těchto barviv umožnilo kultivovat všechny typy polarizovaných makrofágů na jedné kultivační jamce, což při barvení fluorochromy F4/80 nebylo kvůli panelu možné.

Zvýšený mitotransfer mohl být tedy potenciálně reakcí na navýšené hladiny ROS. Nicméně kvůli tomu, že zvýšená produkce ROS byla uměle navozena, nelze brát tento výsledek jako úplně relevantní k naší hypotéze spojitosti ROS a mitotransferu.

Dosud jsme v našem projektu získávali znalosti ohledně zavedené hypotézy souvislosti ROS a mitotransferu výhradně měřením jejich produkce makrofágy. Poslední experimenty této části byly provedeny za účelem finálně potvrdit, nebo vyvrátit tuto hypotézu v *in vitro* nastavení. Očekávali jsme, že inhibicí ROS (inhibitor NAC) a NO (inhibitor 1400W), dojde k poklesu mitotransferu. Inhibitor NO byl aplikován z důvodu, že DCFDA v menší míře může značit i produkci NO, což by mohlo vést k mírnému zkreslení výsledků. Krom toho jsme usuzovali, že NO by potenciálně mohl představovat další regulační faktor tím, že se jedná také o stresovou a signalizační molekulu. Získané výsledky ale naši hypotézu nepodpořily. I přesto, že při použití inhibitorů a jejich kombinací došlo k poklesu produkce ROS, mitotransfer ovlivněn nebyl. K problematice inhibice ROS a mitotransferu se nepojí prakticky žádné publikace. V naší laboratoři byl ale pozorován pokles mitotransferu po působení NAC u B lymfocytů (data nepublikována). Je ale zřejmé, že makrofágy, jakožto výrazně odlišný buněčný typ, reagují na inhibici odlišně. NAC je po dlouhá léta vnímán jako univerzální antioxidant, který se využívá i v klinické praxi. Pokud se ale zaměříme na přesné mechanismy jeho fungování, můžeme diskutovat jeho protichůdné účinky. NAC je schopen neutralizovat hydroxylové radikály a kyselinu chlornou, avšak vůči superoxidu či peroxidu vodíku je jeho účinnost zanedbatelná (Aruoma et al., 1989). Tím se dostáváme na úroveň jednotlivých molekul náležících k ROS, které by mohly s odlišnou mírou regulovat mitotransfer. Dalším efektem působení NAC by mohla být také aktivace jiných stresových drah, které by mohly teoreticky také regulovat mitotransfer. K identifikaci těchto stresových drah je nezbytný další intenzivní výzkum, jelikož nyní se pohybujeme v rovině pouhých spekulací.

Poslední část tohoto projektu se věnovala procesu mitotransferu z MSC do makrofágů v *in vivo* modelu (viz Výsledky, 5.3). Pro účely izolace MSC byl zvolen transgenní myší model *mito:mKate2*, jejíž mitochondrie konstitutivně exprimují červený fluorescenční protein. Po 48 hodinách od intraperitoneálního podání LPS byla analyzována infiltrace makrofágů do jater s cílem ověřit, zda doopravdy dochází k navození akutního zánětu. Dle dat, která zobrazují signifikantní nárůst makrofágového osídlení jater po injekci LPS, lze usoudit, že navození zánětu bylo úspěšné. U jedinců, kteří obdrželi 24 hodin od navození zánětu MSC, došlo k poklesu infiltrace makrofágů, což by mohlo odkazovat na protizánětlivé působení MSC. V další fázi jsme přistoupili k měření mitotransferu. Po injekci MSC do myši s navozeným zánětem (BALB/c), byl měřen mitotransfer v peritoneu a v orgánech souvisejících s peritoneální dutinou, jmenovitě jater, sleziny a pWAT. Výsledky ukazují nejvyšší mitotransfer do jaterních makrofágů a makrofágů izolovaných z pWAT, zatímco v peritoneální dutině byl mitotransfer

signifikantně nižší a ve slezině téměř neprobíhal. Při srovnání výsledků mitotransferu do tkáňových makrofágů *in vitro* a dat získaných v rámci *in vivo* modelu, zjišťujeme, že trendy jsou takřka opačné. V první části diplomové práce, která se věnovala tématice mitotransferu v *in vitro* podmínkách, byl totiž nejnížší přenos mitochondrií zaznamenán u makrofágů získaných z jater a pWAT. V první řadě, *in vitro* a *in vivo* modely nelze přímo srovnávat, jelikož každé z těchto nastavení přináší odlišné podmínky ovlivňující buňky a jejich interakce. Data týkající se přenosu mitochondrií v *in vivo* modelu by se dala interpretovat především v kontextu metabolisme LPS. Játra jsou primárním místem detoxifikace LPS. Po intraperitoneálním podání je LPS absorbováno viscerálním peritoneem, které je v kontaktu s orgány související s břišní dutinou. Krevní cévy zásobující viscerální peritoneum odvádí LPS nejdříve do jater, a poté až skrze portální žílu do centrální cirkulace a ostatních orgánů (Lukas et al., 1971). Na LPS mohou reagovat makrofágy jater, konkrétně např. Kupfferovy buňky, což má za následek zánětlivou signalizaci. Důsledkem této signalizace může být oxidativní vzplanutí, které vede ke zvýšení hladin ROS, což by mohlo podněcovat přenos mitochondrií z MSC a opět podporovat naši hypotézu. Současně existují studie na myších, které stojí proti obecnému vnímání mechanismu detoxifikace LPS u akutně navozeného zánětu. Citovaná studie popisuje, že LPS může být po jeho intraperitoneálním podání vychytáván lipoproteiny vysoké hustoty (HDL), které maskují lipid A, tedy část molekuly stojící za toxickým charakterem. Tím je snižována toxicita LPS a po dopravení LPS do jater není zánět rozvíjen v takové míře (Nguyen et al., 2021). Konkrétní mapování metabolisme LPS by vyžadovalo v našem projektu další experimenty. Druhý nejvyšší přenos byl zaznamenán v pWAT, což je tkáň, ze které byly MSC v našem projektu izolovány. Je možné, že v tomto případě tedy dochází k „homingu“ MSC zpět do tkáně původu a předávání mitochondrií v důsledku intraperitoneálního podání LPS, jelikož detoxifikace v játrech není nikdy 100%, především při navození systemického zánětu. V peritoneální dutině byly naměřeny nízké hladiny mitotransferu. Za tím může stát skutečnost, že LPS je po jeho podání prakticky ihned transportován do jater, jak bylo zmíněno výše. Tím, že byl LPS rychle odváděn do okolních tkání, pravděpodobně v peritoneální dutině nebyl přítomen stimul pro přenos. Téměř nulový přenos mitochondrií do makrofágů sleziny by mohl souviset s osídlením rezidentními makrofágy, které sice v našem projektu nebyly blíže charakterizovány, ale dle dostupné literatury by mohly po stimulaci LPS preferenčně vykazovat funkce spojené s M2 fenotypem (Wang et al., 2013). Zmiňovaná studie byla ale provedena v *in vitro* a *in vivo* systému bude situace nejspíš složitější. Toto protizánětlivé a homeostatické nastavení by mohlo snižovat jejich potřebu přijímat mitochondrie od MSC. Interpretace získaných dat o mitotransferu v *in vivo* modelu je tedy velmi komplikovaná a v rovině pouhých úvah, které by bylo vhodné uvést na rovinu faktů dalšími experimenty.

Po analýze dat z mitotransferu a zjištění, že mitotransfer probíhá nejvíce do jaterních makrofágů, jsme se rozhodli naše pozorování podpořit pomocí další metody, kterou byla fluorescenční mikroskopie jaterních řezů. Ze snímků je zřejmé, že MSC infiltrovaly do jater, kde předávaly mitochondrie (MitoTracker Red CMXRos), ač nebylo detekováno, do jakého typu buněk. Lze ale usuzovat, že se bude jednat mimo jiné i o makrofágy, což ostatně ukazují i data získaná pomocí FC. MSC jsou na snímku uspořádány koncentricky, nejspíše kolem cévy, z čehož lze vyvodit, že se MSC do jater migrovaly z krve. Mikroskopii jaterních řezů by bylo vhodné dále optimalizovat takovým směrem, který by umožnil získat více informací o donorové a akceptorové buňce.

Abychom získaly detailnější poznatky ohledně předávání mitochondrií z MSC, sledovali jsme infiltraci MSC do jednotlivých tkání. MSC jsou migratorní buňky, které vykazují schopnost pohybu v závislosti na různých stimulech (shrnutí v: Fu et al., 2019). Očekávali jsme, že data týkající se infiltrace budou pozitivně korelovat s daty o přenosu mitochondrií z MSC. V rozporu s našimi předpoklady jsme získali výsledky ukazující, že nejvíce MSC bylo zachyceno ve slezině, poté pWAT a téměř žádné MSC nebyly detekovány v játrech. Vysvětlení může spočívat ve způsobech, kterými se MSC mohou do tkání dostávat. MSC se po podání nejspíše dostaly do centrální cirkulace buďto přímo průnikem přes endotel, nebo skrze lymfu. Data ukazují, že MSC se primárně hromadí ve slezině a centrální cirkulaci se také mohly dostat do pWAT. Slezina sice může představovat místo přirozeného hromadění MSC, ale k přenosu mitochondrií docházet nemusí, pokud chybí stimul ze strany recipientní buňky a mikroprostředí obecně. U pWAT je také pravděpodobný již zmíněný přirozený „homing“ MSC do tkáně jejich původu. MSC se sice dostávaly do jater v menších množstvích, ale z důvodu metabolického stresu a signálů nebezpečí předávaly své mitochondrie. Kromě toho, Kupfferovy buňky mají vysokou schopnost fagocytózy a mohly pohlcovat mrtvé MSC (Dixon et al., 2013). To mohlo vést ke snížené schopnosti detekovat MSC, ale mitotransfer ano (MitoTracker Red CMXRos signál). Problematice migrace MSC po jejich intraperitoneálním podání se věnovala i studie na zdravých myších. Ukázala, že většina intraperitoneálně podaných MSC se usazuje v peritoneu a do centrální cirkulace se dostává naprostá minorita injikovaných MSC (Bazhanov et al., 2016). Můžeme ale diskutovat, že v našem modelu akutního zánětu MSC migrovaly z peritoneální dutiny do zánětlivých tkání, a to nejspíše na základě mediátorů typu chemokinů. Rozvolněný endotel cév, který je běžným jevem endoteliální aktivace při zánětu, mohl napomoci průniku MSC do krevního oběhu.

In vivo model jsme dále využili pro zodpovězení otázky týkající se vlivu přijetí mitochondrií na samotné makrofágy izolované z jater a pWAT (tkáně s největším přenosem mitochondrií). Po zvolení znaků, které slouží především k charakterizaci pro- nebo protizánětlivého nastavení makrofágů, jsme se nejdříve zaměřili na rozdíly v jejich expresi po

navození zánětu a po injikaci MSC. Očekávali jsme, že u protizánětlivých znaků, jako je CD206 a MerTK, bude docházet ke snížení jejich exprese po navození zánětu a k opětovnému navýšení exprese po administraci MSC. To se potvrdilo pouze u CD206. U MHC II. třídy a CD80, jejichž zvýšená exprese je spojována především s prozánětlivým fenotypem, bylo naopak předpokládáno, že se jejich exprese po navození zánětu zvýší. To se bohužel neprokázalo. V druhé fázi analýzy jsme porovnali populace makrofágů, které obdržely mitochondrie (mtt^+) a těch, které nikoliv (mtt^-). U mtt^+ makrofágů byla detekována vyšší exprese protizánětlivých znaků CD206 a MerTK oproti mtt^- makrofágům. Tuto skutečnost lze interpretovat dvěma způsoby. Buďto příjmem mitochondrií došlo k podpoře polarizace do M2 fenotypu, nebo jsou mitochondrie preferenčně předávány do M2 fenotypu. Rezoluce zánětu a s ním spojená polarizace do protizánětlivých makrofágů, je proces trvající delší dobu než takovou, která byla zvolena v našem experimentálním nastavení. Na základě toho lze diskutovat, že se jedná spíše o preferenční předávání do M2 makrofágů. V souladu s tím jsou i data získaná ve studii popisující navození M2 fenotypu po předání mitochondrií z MSC v modelu akutní dechové tísně. Zde byl tento protizánětlivý fenotyp popisován po 72 hodinách od začátku společné kultivace MSC a makrofágů (Morrison et al., 2017). Citovaná publikace ale popisovala *in vitro* nastavení. Ani na základě toho, že exprese MHC II. třídy a CD80 buď nevykazovala mezi populacemi rozdíly, nebo byly rozdíly opačné, nelze dospět k ucelenému závěru o vlivu přijetí mitochondrií na makrofágy. *In vivo* modelem jsme se znovu pokusili objasnit hypotézu souvislosti ROS a mitotransferu, avšak získaná data naši hypotézu nepotvrdila. Komplexita *in vivo* systému, společně s přítomností heterogenních makrofágových populací, ztěžuje interpretaci výsledků. Tento experiment by bylo vhodné optimalizovat co do časového nastavení a prodloužit dobu působení MSC před izolací orgánů. Tím bychom mohli dosáhnout viditelnějších rozdílů v expresi makrofágových znaků.

Tento diplomový projekt využil široké spektrum metod a experimentálních nastavení k dosažení charakterizace procesů, které dosud nebyly popsány v publikované literatuře. Limitace této práce spočívají v několika faktorech, které by bylo do budoucna vhodné optimalizovat. Jedná se především o omezení související s absencí bližší charakterizace izolovaných makrofágů z tkání. Bylo by vhodné blíže popsat izolované makrofágy, např. fenotypizací, jelikož v tomto bodě se lze pouze domnívat, zda se jedná o TRM, nebo ty, které vznikly z monocytárních prekurzorů z kostní dřeně. Dá se ale odvodit, že by se mohlo jednat především o tkáňové rezidentní populace, jelikož ve většině experimentů bylo pracováno s fyziologickým nastavením, tudíž zvýšená infiltrace monocytů a jejich diferenciaci na makrofágy v tkáních nejspíše neprobíhala. Bližší charakterizace makrofágů by pomohla přesnější interpretaci dat. Hypotéza souvislosti ROS a mitotransferu se v plném rozsahu nepotvrdila. To může opět souviset s komplexitou *in vivo* systému nebo s nemožností

porovnávat data získaná z experimentů provedených na tkáňových makrofázích a těch na BMdM. Mitochondriální transfer je nedostatečně prozkoumaný fenomén a jeho průběh mezi MSC a makrofágy je dále komplikovaný dynamickou povahou makrofágů. I přesto tato práce přinesla mnoho poznatků, které doposud nebyly v literatuře popsány a může sloužit jako základ pro další výzkum fenoménu mitochondriálního transferu.

7. Závěr

- Potvrdili jsme, že mitotransfer mezi MSC (donorová buňka) a makrofágy (akceptorová buňka) probíhá, a to se signifikantními rozdíly mezi makrofágy izolovanými z tkání a bez signifikantních rozdílů mezi makrofágy polarizovanými do pro- a protizánětlivých fenotypů (*in vitro* nastavení). Nejnižší mitotransfer byl zaznamenán u makrofágů izolovaných z jater a pWAT.
- Mitotransfer *in vitro* byl také pozorován a potvrzen s využitím fluorescenční mikroskopie.
- Změřili jsme produkci ROS tkáňovými a polarizovanými makrofágy a určili jsme relativní expresi vybraných genů podílejících se na antioxidačních procesech v makrofázích jednotlivých tkání. Játra se ukázala jako orgán s nejnižší produkcí ROS a nejvyšší relativní expresi antioxidačních enzymů.
- Kultivovali jsme MSC společně se smíšenou populací buněk tvořenou různě polarizovanými makrofágy a zaznamenali jsme výrazný nárůst přenosu mitochondrií při této společné kultivaci v porovnání se samostatnými kultivacemi MSC a makrofágů ovlivněných jedním typem polarizačního stimulu. To bylo přisouzeno arteficiálním navýšením hladin ROS vlivem metodologie barvení.
- Zkoumali jsme mitotransfer v *in vivo* transgenním myším modelu *mito::mKate2*. Díky němu byl potvrzen úspěšně navozený zánět a přenos mitochondrií z intraperitoneálně administrovaných MSC, který se signifikantně lišil mezi tkáněmi souvisejícími s peritoneální dutinou a dutinou samotnou. Nejvyšší mitotransfer byl zaznamenán u makrofágů jater a pWAT, zatímco u sleziny a peritonea se blížil nule. Byla také analyzována migrace MSC z peritoneální dutiny, přičemž nejvíce jich bylo detekováno ve slezině a pWAT. Rozdíly exprese znaků souvisejících s pro- nebo protizánětlivým charakterem makrofágů nám pomohly určit rozdíly mezi kontrolními jedinci a zánětem a také mezi populací makrofágů, které obdržely mitochondrie od MSC a těch, které ne.
- Jako možný faktor, který by mohl regulovat mitotransfer, byly navrženy ROS. Navržená hypotéza souvislosti produkce ROS makrofágy a preference či míry mitotransferu z MSC se ale jednoznačně nepotvrdila.

8. Seznam použité literatury

Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P.F., Figeac, F., Coudert, A.E., Le Coz, O., Christov, C., Baudin, X., Auber, F., Ylou, R., Dubois-Randé, J.L., & Anne-Marie, R. (2011). Human Mesenchymal Stem Cells Reprogram Adult Cardiomyocytes Toward a Progenitor-Like State Through Partial Cell Fusion and Mitochondria Transfer. *Stem Cells* **29**, 812–824.

Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., Wani, M.R., Roy, S.S., Mabalirajan, U., Ghosh, B., & Agrawal, A. (2014). Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO Journal* **33**, 994–1010.

Ai, J., Mowla, S.J., & Ebrahimi, S. (2020). Tracking of intraperitoneally and direct intrahepatic administered mesenchymal stem cells expressing miR-146a-5p in mice hepatic tissue. *Health Biotechnology and Biopharma* **4(3)**, 56-76

Akhter, W., Nakhle, J., Vaillant, L., Garcin, G., Le Saout, C., Simon, M., Crozet, C., Djouad, F., Jorgensen, C., Vignais, M.L., & Hernandez, J. (2023). Transfer of mesenchymal stem cell mitochondria to CD4⁺ T cells contributes to repress Th1 differentiation by downregulating T-bet expression. *Stem Cell Research and Therapy* **14**, 1–16.

Alió del Barrio, J.L., De la Mata, A., De Miguel, M.P., Arnalich-Montiel, F., Nieto-Miguel, T., El Zarif, M., Cadenas-Martín, M., López-Paniagua, M., Galindo, S., Calonge, M., & Alió, J.L. (2022). Corneal Regeneration Using Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells* **11**, 2549.

*dos Anjos Cassado, A. (2017). F4/80 as a major macrophage marker: The case of the peritoneum and spleen. *Results and Problems in Cell Differentiation* **62**, 161–179.

*Ardavín, C., Alvarez-Ladrón, N., Ferriz, M., Gutiérrez-González, A., & Vega-Pérez, A. (2023). Mouse Tissue-Resident Peritoneal Macrophages in Homeostasis, Repair, Infection, and Tumor Metastasis. *Advanced Science* **10**, 2206617.

Arlaukas, S.P., Garren, S.B., Garriss, C.S., Kohler, R.H., Oh, J., Pittet, M.J., & Weissleder, R. (2018). Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages. *Theranostics* **8**, 5842.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., & Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* **6**, 593–597.

Avila-Ponce de León, U., Vázquez-Jiménez, A., Matadamas-Guzman, M., Pelayo, R., & Resendis-Antonio, O. (2021). Transcriptional and Microenvironmental Landscape of Macrophage Transition in Cancer: A Boolean Analysis. *Frontiers in Immunology* **12**, 642842.

Bahsoun, S., Brown, M.J., Coopman, K., & Akam, E.C. (2023). Cryopreservation of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells at High Concentration Is Feasible. *Biopreservation and Biobanking* **21**, 450–457.

Barrasso, A.P., Tong, X., & Poché, R.A. (2017). The mito::mKate2 mouse: a far-red fluorescent reporter mouse line for tracking mitochondrial dynamics in vivo. *Genesis* **56**, 10.1002/dvg.23087.

Bazhanov, N., Ylostalo, J.H., Bartosh, T.J., Tiblow, A., Mohammadipoor, A., Foscett, A., & Prockop, D.J. (2016). Intraperitoneally infused human mesenchymal stem cells form aggregates with mouse immune cells and attach to peritoneal organs. *Stem Cell Research and Therapy* **7**, 1–14.

Bertholet, A.M., Natale, A.M., Bisignano, P., Suzuki, J., Fedorenko, A., Hamilton, J., Brustovetsky, T., Kazak, L., Garrity, R., Chouchani, E.T., Brustovetsky, N., Grabe, M., & Kirichok, Y. (2022). Mitochondrial uncouplers induce proton leak by activating AAC and UCP1. *Nature* **606**, 180–187.

Bigildeev, A.E., Zezina, E.A., Shipounova, I.N., & Drize, N.J. (2015). Interleukin-1 beta enhances human multipotent mesenchymal stromal cell proliferative potential and their ability to maintain hematopoietic precursor cells. *Cytokine* **71**, 246–254.

Blériot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., & Lecuit, M. (2015). Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* **42**, 145–158.

*Borcherding, N., & Brestoff, J.R. (2023). The power and potential of mitochondria transfer. *Nature* 2023 623:7986 **623**, 283–291.

Boukelmoune, N., Chiu, G.S., Kavelaars, A., & Heijnen, C.J. (2018). Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to neural stem cells protects against the neurotoxic effects of cisplatin. *Acta Neuropathologica Communications* **6**, 139.

Brestoff, J.R., Wilen, C.B., Moley, J.R., et al. (2021). Intercellular Mitochondria Transfer to Macrophages Regulates White Adipose Tissue Homeostasis and Is Impaired in Obesity. *Cell Metabolism* **33**, 270-282.e8.

Bulati, M., Miceli, V., Gallo, A., Amico, G., Carcione, C., Pampalone, M., & Conaldi, P.G. (2020). The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal

Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. *Frontiers in Immunology* **11**, 478134.

Cao, L., Xu, H., Wang, G., Liu, M., Tian, D., & Yuan, Z. (2019). Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells attenuate dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis by promoting M2 macrophage polarization. *International Immunopharmacology* **72**, 264–274.

*Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* **9**, 641–650.

*Caplan, A.I. (2010). What's in a Name? *Tissue Engineering Part A* **16**, 2415–2417.

Chen, L.C., Wang, H.W., & Huang, C.C. (2021). Modulation of inherent niches in 3D multicellular MSC spheroids reconfigures metabolism and enhances therapeutic potential. *Cells* **10**, 2747.

*Chen, S., Saeed, A.F.U.H., Liu, Q., Jiang, Q., Xu, H., Xiao, G.G., Rao, L., & Duo, Y. (2023). Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **8**, 1–35.

Chiu, G.S., Maj, M.A., Rizvi, S., Dantzer, R., Vichaya, E.G., Laumet, G., Kavelaars, A., & Heijnen, C.J. (2017). Pifithrin-m prevents cisplatin-induced chemobrain by preserving neuronal mitochondrial function. *Cancer Research* **77**, 742–752.

Chung, S.J., Lee, T.Y., Lee, Y.H., Baik, K., Jung, J.H., Yoo, H.S., Shim, C.J., Eom, H., Hong, J.Y., Kim, D.J., Sohn, Y.H., & Lee, P.H. (2021). Phase I Trial of Intra-arterial Administration of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients with Multiple System Atrophy. *Stem Cells International* **2021**, 9886877.

*Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., et al. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313.

Deppermann, C., Kratoch, R.M., Peiseler, M., David, B.A., Zindel, J., Silva Castanheira, F.V.E., van der Wal, F., Carestia, A., Jenne, C.N., Marth, J.D., & Kubes, P. (2020). Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *Journal of Experimental Medicine* **217**.

*Distler, J.H.W., Györfi, A.H., Ramanujam, M., Whitfield, M.L., Königshoff, M., & Lafyatis, R. (2019). Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nature Reviews Rheumatology* **15**, 705–730.

*Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., & Nagy, L.E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. *Comprehensive Physiology* **3**, 785.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., & Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317.

Du, G., Cheng, X., Zhang, Z., Han, L., Wu, K., Li, Y., & Lin, X. (2021). TGF-Beta Induced Key Genes of Osteogenic and Adipogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells and MiRNA–mRNA Regulatory Networks. *Frontiers in Genetics* **12**, 759596.

Enders, M., Franken, L., Philipp, M.-S., Kessler, N., Baumgart, A.-K., Eichler, M., Wiertz, E.J.H., Garbi, N., & Kurts, C. (2020). Splenic Red Pulp Macrophages Cross-Prime Early Effector CTL That Provide Rapid Defense against Viral Infections. *The Journal of Immunology* **204**, 87–100.

Engür-Öztürk, S., Kaya-Tilkı, E., Cantürk, Z., & Dikmen, M. (2024). Enhanced angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells via THP-1-derived M2c-like macrophages and treatment with proteasome inhibitors ‘bortezomib and ixazomib.’ *APMIS* **132**, 594–607.

*Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.L., & Mignotte, B. (2012). The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **942**, 157–183.

Fan, Y., Herr, F., Vernochet, A., Mennesson, B., Oberlin, E., & Durrbach, A. (2019). Human Fetal Liver Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Impair Natural Killer Cell Function. *Stem Cells and Development* **28**, 44–55.

Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development* **16**, 381–390.

*Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, G. (2019). Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells* **8**.

Gao, J., Qin, A., Liu, D., et al. (2019). Endoplasmic reticulum mediates mitochondrial transfer within the osteocyte dendritic network. *Science Advances* **5**.

Gola, A., Dorrington, M.G., Speranza, E., Sala, C., Shih, R.M., Radtke, A.J., Wong, H.S., Baptista, A.P., Hernandez, J.M., Castellani, G., Fraser, I.D.C., & Germain, R.N. (2020). Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence. *Nature* **589**, 131–136.

Gorgun, C., Ceresa, D., Lesage, R., Villa, F., Reverberi, D., Balbi, C., Santamaria, S., Cortese, K., Malatesta, P., Geris, L., Quarto, R., & Tasso, R. (2021). Dissecting the effects of preconditioning with inflammatory cytokines and hypoxia on the angiogenic potential of mesenchymal stromal cell (MSC)-derived soluble proteins and extracellular vesicles (EVs). *Biomaterials* **269**, 120633.

*Guerriero, J.L. (2019). Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. *International Review of Cell and Molecular Biology* **342**, 73–93.

Guo, J., Zhang, H., Xia, J., Hou, J., Wang, Y., Yang, T., Wang, S., Zhang, X., Chen, X., & Wu, X. (2018a). Interleukin-1 β induces intercellular adhesion molecule-1 expression, thus enhancing the adhesion between mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells via the p38 MAPK signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine* **41**, 1976–1982.

Guo, Y.C., Chiu, Y.H., Chen, C.P., & Wang, H.S. (2018b). Interleukin-1 β induces CXCR3-mediated chemotaxis to promote umbilical cord mesenchymal stem cell transendothelial migration. *Stem Cell Research Therapy* **9**, 1–15.

Hajkova, M., Hermankova, B., Javorkova, E., Bohacova, P., Zajicova, A., Holan, V., & Krulova, M. (2017a). Mesenchymal Stem Cells Attenuate the Adverse Effects of Immunosuppressive Drugs on Distinct T Cell Subpopulations. *Stem Cell Reviews and Reports* **13**, 104–115.

Hajkova, M., Javorkova, E., Zajicova, A., Trosan, P., Holan, V., & Krulova, M. (2017b). A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype. *J Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **11**, 1456–1465.

Haka, A.S., Barbosa-Lorenzi, V.C., Lee, H.J., Falcone, D.J., Hudis, C.A., Dannenberg, A.J., & Maxfield, F.R. (2016). Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation. *Journal of Lipid Research* **57**, 980–992.

*Halliwell, B. (2023). Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **25**, 13–33.

Han, H., Hu, J., Yan, Q., Zhu, J., Zhu, Z., Chen, Y., Sun, J., & Zhang, R. (2016). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue injured H9c2 cells via transferring intact mitochondria through tunneling nanotubes in an in vitro simulated ischemia/reperfusion model. *Molecular Medicine Reports* **13**, 1517–1524.

Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., et al. (2015). C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* **42**, 665–678.

*Honold, L., & Nahrendorf, M. (2018). Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circulation Research* **122**, 113–127.

Huang, J., Chen, Y., Zhou, L., Ren, J., Tian, M., Yang, Q., Wang, L., Wu, Y., Wen, J., & Yang, Q. (2024). M2a macrophages regulate fibrosis and affect the outcome after stroke via PU.1/mTOR pathway in fibroblasts. *Neurochemistry International* **173**, 105674.

Huang, R., Qin, C., Wang, J., Hu, Y., Zheng, G., Qiu, G., Ge, M., Tao, H., Shu, Q., & Xu, J. (2019). Differential effects of extracellular vesicles from aging and young mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Aging (Albany NY)* **11**, 7996.

Ippolito, L., Morandi, A., Taddei, M.L., Parri, M., Comito, G., Iscaro, A., Raspollini, M.R., Magherini, F., Rapizzi, E., Masquelier, J., Muccioli, G.G., Sonveaux, P., Chiarugi, P., & Giannoni, E. (2019). Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer. *Oncogene* **38**, 5339–5355.

Ishida, K., Nagatake, T., Saika, A., Kawai, S., Node, E., Hosomi, K., & Kunisawa, J. (2023). Induction of unique macrophage subset by simultaneous stimulation with LPS and IL-4. *Frontiers in Immunology* **14**, 1111729.

Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., & Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature Medicine* **18**, 759–765.

Iwai, H., Ataka, K., Suzuki, H., Dhar, A., Kuramoto, E., Yamanaka, A., & Goto, T. (2021). Tissue-resident M2 macrophages directly contact primary sensory neurons in the sensory ganglia after nerve injury. *Journal of Neuroinflammation* **18**, 1–15.

Jackaman, C., Yeoh, T.L., Acuil, M.L., Gardner, J.K., & Nelson, D.J. (2016). Murine mesothelioma induces locally-proliferating IL-10+TNF- α +CD206–CX3CR1⁺ M3 macrophages that can be selectively depleted by chemotherapy or immunotherapy. *Oncoimmunology* **5**.

Jackson, M. V., Morrison, T.J., Doherty, D.F., McAuley, D.F., Matthay, M.A., Kissenpfennig, A., O’Kane, C.M., & Krasnodembskaya, A.D. (2016). Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells

Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells* **34**, 2210–2223.

Jiang, Y., Tang, Y., Hoover, C., et al. (2021). Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice. *Cell Death and Differentiation* **28**, 3009–3021.

Jiao, Y., Tong, C.S.W., Zhao, L., Zhang, Y., Nicholls, J.M., & Rainer, T.H. (2024). Intraperitoneal versus intranasal administration of lipopolysaccharide in causing sepsis severity in a murine model: a preliminary comparison. *Laboratory Animal Research* **40**, 1–7.

*Jovic, D., Yu, Y., Wang, D., Wang, K., Li, H., Xu, F., Liu, C., Liu, J., & Luo, Y. (2022). A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Reviews and Reports* **18**, 1525–1545.

*Juhas, U., Ryba-Stanisławowska, M., Szargiej, P., & Myśliwska, J. (2015). Different pathways of macrophage activation and polarization. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* **69**, 496–502.

Jung, S.B., Choi, M.J., Ryu, D., et al. (2018). Reduced oxidative capacity in macrophages results in systemic insulin resistance. *Nature Communications* **9**, 1–15.

*Kim, S.Y., & Nair, M.G. (2019). Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunology and Cell Biology* **97**, 258–267.

Kim, J.M., Kim, H.G., & Son, C.G. (2018). Tissue-Specific Profiling of Oxidative Stress-Associated Transcriptome in a Healthy Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 3174.

Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., & Dimmeler, S. (2005). Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: A novel mechanism for cell fate changes? *Circulation Research* **96**, 1039–1041.

Kundrotas, G., Gasperskaja, E., Slapsyte, G., Gudleviciene, Z., Krasko, J., Stumbryte, A., & Liudkeviciene, R. (2016). Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget* **7**, 10788.

Kuo, C.H., Tsai, M.L., Li, C.H., Hsiao, H.P., Chao, M.C., Lee, M.S., Lin, Y.C., & Hung, C.H. (2021). Altered Pattern of Macrophage Polarization as a Biomarker for Severity of Childhood Asthma. *Journal of Inflammation Research* **14**, 6011–6023.

*Lazarov, T., Juarez-Carreño, S., Cox, N., & Geissmann, F. (2023). Physiology and diseases of tissue-resident macrophages. *Nature* **618**, 698–707.

*Lee, S.H., & Sacks, D.L. (2024). Resilience of dermis resident macrophages to inflammatory challenges. *Experimental & Molecular Medicine* **56**, 2105–2112.

Lévesque, J.P., Summers, K.M., Bisht, K., Millard, S.M., Winkler, I.G., & Pettit, A.R. (2021). Macrophages form erythropoietic niches and regulate iron homeostasis to adapt erythropoiesis in response to infections and inflammation. *Experimental Hematology* **103**, 1–14.

Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z.N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M.W.W., & Li, C.Y. (2007). Regulation of HIF-1 α Stability through S-Nitrosylation. *Molecular Cell* **26**, 63–74.

Li, F., Wu, J., Li, D., Hao, L., Li, Y., Yi, D., Yeung, K.W.K., Chen, D., Lu, W.W., Pan, H., Wong, T.M., & Zhao, X. (2022a). Engineering stem cells to produce exosomes with enhanced bone regeneration effects: an alternative strategy for gene therapy. *Journal Nanobiotechnology* **20**, 1–23.

Li, H., Wang, C., He, T., Zhao, T., Chen, Y. ying, Shen, Y. liang, Zhang, X., & Wang, L. lin (2019a). Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Motor Neurons in Spinal Cord Injury Rats via Gap Junction. *Theranostics* **9**, 2017.

Li, N., Gao, Z., Zhao, L., Du, B., Ma, B., Nian, H., & Wei, R. (2022b). MSC-Derived Small Extracellular Vesicles Attenuate Autoimmune Dacryoadenitis by Promoting M2 Macrophage Polarization and Inducing Tregs via miR-100-5p. *Frontiers in Immunology* **13**, 888949.

Li, Q., Wang, Y., Shi, L., Wang, Q., Yang, G., Deng, L., Tian, Y., Hua, X., & Yuan, X. (2023). Arginase-1 promotes lens epithelial-to-mesenchymal transition in different models of anterior subcapsular cataract. *Cell Communication and Signaling* **21**, 1–14.

Li, Y., Zhang, D., Xu, L., Dong, L., Zheng, J., Lin, Y., Huang, J., Zhang, Y., Tao, Y., Zang, X., Li, D., & Du, M. (2019b). Cell–cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models. *Cellular & Molecular Immunology* **16**, 908–920.

Liang, W., Sagar, S., Ravindran, R., et al. (2023). Mitochondria are secreted in extracellular vesicles when lysosomal function is impaired. *Nature Communications* **14**, 1–18.

Liao, L., Shi, B., Chang, H., Su, X., Zhang, L., Bi, C., Shuai, Y., Du, X., Deng, Z., & Jin, Y. (2017). Heparin improves BMSC cell therapy: Anticoagulant treatment by heparin

improves the safety and therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell cytotherapy. *Theranostics* **7**, 106.

Lipowsky, H.H., Bowers, D.T., Banik, B.L., & Brown, J.L. (2018). Mesenchymal Stem Cell Deformability and Implications for Microvascular Sequestration. *Annals of Biomedical Engineering* **46**, 640–654.

Liu, F., Dai, S., Feng, D., et al. (2020). Distinct fate, dynamics and niches of renal macrophages of bone marrow or embryonic origins. *Nature Communications* **11**, 1–16.

Liu, K., Guo, L., Zhou, Z., Pan, M., & Yan, C. (2019a). Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvascular Research* **123**, 74–80.

Liu, Y., Yuan, X., Muñoz, N., Logan, T.M., & Ma, T. (2019b). Commitment to Aerobic Glycolysis Sustains Immunosuppression of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine* **8**, 93–106.

Lou, H., Huang, Y., Chu, X., Wang, Y., Wang, C., & Zhang, L. (2023). M2 Macrophages Upregulated by Allergen Exposure in Seasonal Allergic Rhinitis. *International Archives of Allergy Immunology* **184**, 587–597.

Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., Weng, Y., Lee, V.W.S., Zheng, G., Tan, T.K., Wang, X., Alexander, S.I., Harris, D.C.H., & Wang, Y. (2013). Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney International* **84**, 745–755.

Lukas, G., Brindle, S.D., & Greengard, P. (1971). The Route Of Absorption Of Intraperitoneally Administered Compounds. *The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* **178**, 562–566.

Luo, L., Zhou, Y., Zhang, C., Huang, J., Du, J., Liao, J., Bergholt, N.L., Bünger, C., Xu, F., Lin, L., Tong, G., Zhou, G., & Luo, Y. (2020). Feeder-free generation and transcriptome characterization of functional mesenchymal stromal cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* **48**, 101990.

Luz-Crawford, P., Hernandez, J., Djouad, F., Luque-Campos, N., Caicedo, A., Carrère-Kremer, S., Brondello, J.M., Vignais, M.L., Pène, J., & Jorgensen, C. (2019). Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem Cell Research and Therapy* **10**, 1–13.

Lyons, A.B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods* **243**, 147–154.

Mahrouf-Yorgov, M., Augeul, L., Da Silva, C.C., et al. (2017). Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death & Differentiation* **24**, 1224–1238.

Marlein, C.R., Zaitseva, L., Piddock, R.E., Robinson, S.D., Edwards, D.R., Shafat, M.S., Zhou, Z., Lawes, M., Bowles, K.M., & Rushworth, S.A. (2017). NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood* **130**, 1649–1660.

*Martin, K.E., & García, A.J. (2021). Macrophage phenotypes in tissue repair and the foreign body response: Implications for biomaterial-based regenerative medicine strategies. *Acta Biomaterialia* **133**, 4–16.

Masterson, C.H., Tabuchi, A., Hogan, G., Fitzpatrick, G., Kerrigan, S.W., Jerkic, M., Kuebler, W.M., Laffey, J.G., & Curley, G.F. (2021). Intra-vital imaging of mesenchymal stromal cell kinetics in the pulmonary vasculature during infection. *Scientific Reports* **11**, 1–12.

Meizlish, M.L., Kimura, Y., Pope, S.D., Matta, R., Kim, C., Philip, N.H., Meyaard, L., Gonzalez, A., & Medzhitov, R. (2024). Mechanosensing regulates tissue repair program in macrophages. *Science Advances* **10**, 6906.

Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X.M., Malmström, V., & Harris, R.A. (2014). An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. *Scandinavian Journal of Immunology* **79**, 305.

Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., & Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology* **164**, 6166–6173.

*Mishra, P., & Chan, D.C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 634–646.

Mistry, J.J., Marlein, C.R., Moore, J.A., et al. (2019). ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection. *Proceedings of National Academy of Sciences* **116**, 24610–24619.

*Mohammad-Rezaei, M., Arefnezhad, R., Ahmadi, R., Abdollahpour-Alitappeh, M., Mirzaei, Y., Arjmand, M.H., Ferns, G.A., Bashash, D., & Bagheri, N. (2021). An overview of the innate and adaptive immune system in atherosclerosis. *IUBMB Life* **73**, 64–91.

Mohning, M.P., Thomas, S.M., Barthel, L., Mould, K.J., McCubbrey, A.L., Frasch, S.C., Bratton, D.L., Henson, P.M., & Janssen, W.J. (2018). Phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages during acute lung injury requires MerTK. *Translational Research in Acute Lung Injury and Pulmonary Fibrosis* **314**, L69–L82.

*Monzel, A.S., Enríquez, J.A., & Picard, M. (2023). Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction. *Nature Metabolism* **5**, 546.

Morrison, T.J., Jackson, M. V., Cunningham, E.K., Kissenpfennig, A., McAuley, D.F., O’Kane, C.M., & Krasnodembskaya, A.D. (2017). Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **196**, 1275–1286.

Musrati, M.A., Stijlemans, B., Azouz, A., et al. (2024). Infection history imprints prolonged changes to the epigenome, transcriptome and function of Kupffer cells. *Journals of Hepatology* **81**, 1023–1039.

Nguyen, M., Pallot, G., Jalil, A., Tavernier, A., Dusuel, A., Le Guern, N., Lagrost, L., Pais de Barros, J.P., Choubley, H., Bergas, V., Guinot, P.G., Masson, D., Bouhemad, B., & Gautier, T. (2021). Intra-Abdominal Lipopolysaccharide Clearance and Inactivation in Peritonitis: Key Roles for Lipoproteins and the Phospholipid Transfer Protein. *Frontiers in Immunology* **12**, 622935.

Park, M.W., Cha, H.W., Kim, J., Kim, J.H., Yang, H., Yoon, S., Boonpraman, N., Yi, S.S., Yoo, I.D., & Moon, J.S. (2021). NOX4 promotes ferroptosis of astrocytes by oxidative stress-induced lipid peroxidation via the impairment of mitochondrial metabolism in Alzheimer’s diseases. *Redox Biology* **41**, 101947.

Pastore, M., Caligiuri, A., Raggi, C., Navari, N., Piombanti, B., Di Maira, G., Rovida, E., Piccinni, M.P., Lombardelli, L., Logiodice, F., Rombouts, K., Petta, S., & Marra, F. (2022). Macrophage MerTK promotes profibrogenic cross-talk with hepatic stellate cells via soluble mediators. *JHEP Reports* **4**, 100444.

Peruzzotti-Jametti, L., Bernstock, J.D., Willis, C.M., et al. (2021). Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles. *PLoS Biology* **19**, e3001166.

Petrenko, Y., Vackova, I., Kekulova, K., Chudickova, M., Koci, Z., Turnovcova, K., Kupcova Skalnikova, H., Vodicka, P., & Kubinova, S. (2020). A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Scientific Reports* **10**, 1–15.

Petta, I., Thorp, M., Ciers, M., Blancke, G., Boon, L., Meese, T., Van Nieuwerburgh, F., Wullaert, A., Grecis, R., Elewaut, D., van Loo, G., & Vereecke, L. (2024). Myeloid A20 is critical for alternative macrophage polarization and type-2 immune-mediated helminth resistance. *Frontiers in Immunology* **15**, 1373745.

*Planat-Benard, V., Varin, A., & Casteilla, L. (2021). MSCs and Inflammatory Cells Crosstalk in Regenerative Medicine: Concerted Actions for Optimized Resolution Driven by Energy Metabolism. *Frontiers in Immunology* **12**, 626755.

Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Vasileva, A.K., Marey, M. V., Galkina, S.I., Isaev, N.K., Sheval, E. V., Polyakov, V.Y., Sukhikh, G.T., & Zorov, D.B. (2007). Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **12**, 1622.

Raes, G., De Baetselier, P., Noël, W., Beschin, A., Brombacher, F., & Hassanzadeh Gh., G. (2002). Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **71**, 597–602.

Resnik, N., Prezelj, T., De Luca, G.M.R., Manders, E., Polishchuk, R., Veranič, P., & Kreft, M.E. (2018). Helical organization of microtubules occurs in a minority of tunneling membrane nanotubes in normal and cancer urothelial cells. *Scientific Reports* **8**, 1–8.

*Rodríguez-Fuentes, D.E., Fernández-Garza, L.E., Samia-Meza, J.A., Barrera-Barrera, S.A., Caplan, A.I., & Barrera-Saldaña, H.A. (2021). Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research* **52**, 93–101.

Rosas, M., Davies, L.C., Giles, P.J., Liao, C. Te, Kharfan, B., Stone, T.C., O'Donnell, V.B., Fraser, D.J., Jones, S.A., & Taylor, P.R. (2014). The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. *Science* **344**, 645–648.

Rosina, M., Ceci, V., Turchi, R., et al. (2022). Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue. *Cell Metabolism* **34**, 533-548.

*Roszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation* **2015**, 816460.

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., & Gerdes, H.H. (2004). Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science (1979)* **303**, 1007–1010.

Sabapathy, V., Ravi, S., Srivastava, V., Srivastava, A., & Kumar, S. (2012). Long-Term Cultured Human Term Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells of Maternal Origin Displays Plasticity. *Stem Cells International* **2012**, 174328.

Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* **14**, 225

Sajti, E., Link, V.M., Ouyang, Z., Spann, N.J., Westin, E., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Prince, L.S., & Glass, C.K. (2020). Transcriptomic and epigenetic mechanisms underlying myeloid diversity in the lung. *Nature Immunology* **21**, 221.

Sartori-Rupp, A., Cordero Cervantes, D., Pepe, A., Gousset, K., Delage, E., Corroyer-Dulmont, S., Schmitt, C., Krijnse-Locker, J., & Zurzolo, C. (2019). Correlative cryo-electron microscopy reveals the structure of TNTs in neuronal cells. *Nature Communications* 2019 **10**, 1–16.

Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., & Chen, Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF3. *Cell* **122**, 669–682.

Shi, M., Sekulovski, N., Whorton, A.E., MacLean, J.A., Greaves, E., & Hayashi, K. (2021). Efficacy of niclosamide on the intra-abdominal inflammatory environment in endometriosis. *FASEB Journal* **35**, e21584.

*Sies, H., & Jones, D.P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**, 363–383.

Silva, H.M., Báfica, A., Rodrigues-Luiz, G.F., et al. (2019). Vasculature-associated fat macrophages readily adapt to inflammatory and metabolic challenges. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 786–806.

Sinclair, K.A., Yerkovich, S.T., Hopkins, P.M.A., & Chambers, D.C. (2016). Characterization of intercellular communication and mitochondrial donation by mesenchymal stromal cells derived from the human lung. *Stem Cell Research Therapy* **7**, 1–10.

*Soliman, H., Theret, M., Scott, W., Hill, L., Underhill, T.M., Hinz, B., & Rossi, F.M.V. (2021). Multipotent stromal cells: One name, multiple identities. *Cell Stem Cell* **28**, 1690–1707.

Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., & Prockop, D.J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 1283–1288.

*Strizova, Z., Benesova, I., Bartolini, R., Novysedlak, R., Cecrdlova, E., Foley, L.K., & Striz, I. (2023). M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality? *Clinical Science* **137**, 1067–1093.

Szydlak, R., Majka, M., Lekka, M., Kot, M., & Laidler, P. (2019). AFM-based Analysis of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 4351.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* **496**, 238–242.

*Taylor, J.P., & Tse, H.M. (2021). The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. *Redox Biology* **48**, 102159.

Terada, K., Sasaki, M., Nagahama, H., Kataoka-Sasaki, Y., Oka, S., Ukai, R., Yokoyama, T., Iizuka, Y., Sakai, T., Fukumura, S., Tsugawa, T., Kocsis, J.D., & Honmou, O. (2023). Therapeutic efficacy of intravenous infusion of mesenchymal stem cells in rat perinatal brain injury. *Pediatric Research* **94**, 1921–1928.

Tofiño-Vian, M., Guillén, M.I., Pérez Del Caz, M.D., Silvestre, A., & Alcaraz, M.J. (2018). Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* **47**, 11–25.

Tolomeo, A.M., Zuccolotto, G., Malvicini, R., De Lazzari, G., Penna, A., Franco, C., Caicci, F., Magarotto, F., Quarta, S., Pozzobon, M., Rosato, A., Muraca, M., & Collino, F. (2023). Biodistribution of Intratracheal, Intranasal, and Intravenous Injections of Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in a Mouse Model for Drug Delivery Studies. *Pharmaceutics* **15**, 548.

*Torralba, D., Baixauli, F., & Sánchez-Madrid, F. (2016). Mitochondria know no boundaries: Mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer. *Front Cell Development Biology* **4**, 223255.

Tran, S., Baba, I., Poupel, L., et al. (2020). Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* **53**, 627-640.e5.

*Ushach, I., & Zlotnik, A. (2016). Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology* **100**, 481–489.

Vaillant, L., Akhter, W., Nakhle, J., Simon, M., Villalba, M., Jorgensen, C., Vignais, M.L., & Hernandez, J. (2024). The role of mitochondrial transfer in the suppression of CD8+ T cell responses by Mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research Therapy* **15**, 394.

*Vannella, K.M., & Wynn, T.A. (2017). Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annual Review of Physiology* **79**, 593–617.

Varghese, M., Clemente, J., Lerner, A., Abrishami, S., Islam, M., Subbaiah, P., & Singer, K. (2022). Monocyte Trafficking and Polarization Contribute to Sex Differences in Meta-Inflammation. *Frontiers of Endocrinology (Lausanne)* **13**, 826320.

Vašek, D., Fikarová, N., Marková, V.N., Honc, O., Pacáková, L., Porubská, B., Somova, V., Novotný, J., Melkes, B., & Krulová, M. (2024). Lipopolysaccharide pretreatment increases the sensitivity of the TRPV1 channel and promotes an anti-inflammatory phenotype of capsaicin-activated macrophages. *Journal of Inflammation (United Kingdom)* **21**, 1–14.

Vasimalla, S., Sato, S., Takenaka, F., Kurose, Y., & Takenaka, S. (2017). Cyclic perylene diimide: Selective ligand for tetraplex DNA binding over double stranded DNA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **25**, 6404–6411.

*Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Frontiers of Immunology* **10**, 466337.

Wang, J., & Kubes, P. (2016). A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell* **165**, 668–678.

Wang, X., & Gerdes, H.H. (2015). Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death & Differentiation* **22**, 1181–1191.

Wang, C., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T.K., Zhao, H., Zhao, Y., Wang, Y., & Harris, D.C.H. (2013). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology* **14**, 1–10.

Wang, F., Zhang, S., Jeon, R., Vuckovic, I., Jiang, X., Lerman, A., Folmes, C.D., Dzeja, P.D., & Herrmann, J. (2018). Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity. *EBioMedicine* **30**, 303–316.

Wang, F., Chen, X., Cheng, H., Song, L., Liu, J., Caplan, S., Zhu, L., & Wu, J.Y. (2021). MICAL2PV suppresses the formation of tunneling nanotubes and modulates mitochondrial trafficking. *EMBO Reports* **22**, e52006.

Wang, R., Ji, Q., Meng, C., Liu, H., Fan, C., Lipkind, S., Wang, Z., & Xu, Q. (2020). Role of gingival mesenchymal stem cell exosomes in macrophage polarization under inflammatory conditions. *International Immunopharmacology* **81**, 106030.

Wang, Y., Cui, J., Sun, X., & Zhang, Y. (2010). Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death & Differentiation* **18**, 732–742.

Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., & Matsukawa, A. (2004). Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* **22**, 460–466.

Welsh, J.A., Goberdhan, D.C.I., O'Driscoll, L., et al. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal Extracellular Vesicles* **13**, e12404.

Wu, K.K.L., Xu, X., Wu, M., Li, X., Hoque, M., Li, G.H.Y., Lian, Q., Long, K., Zhou, T., Piao, H., Xu, A., Hui, H.X., & Cheng, K.K.Y. (2024). MDM2 induces pro-inflammatory and glycolytic responses in M1 macrophages by integrating iNOS-nitric oxide and HIF-1 α pathways in mice. *Nature Communications* **15**, 1–21.

Wu, X., Darlington, D.N., Christy, B.A., Liu, B., Keese, J.D., Salgado, C.L., Bynum, J.A., & Cap, A.P. (2022). Intravenous administration of mesenchymal stromal cells leads to a dose-dependent coagulopathy and is unable to attenuate acute traumatic coagulopathy in rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* **92**, 542–552.

Xia, L., Zhang, C., Lv, N., Liang, Z., Ma, T., Cheng, H., Xia, Y., & Shi, L. (2022). AdMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages. *Theranostics* **12**, 2928.

Xu, N., Liu, H., Qu, F., Fan, J., Mao, K., Yin, Y., Liu, J., Geng, Z., & Wang, Y. (2013). Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling. *Experimental and Molecular Pathology* **94**, 33–39.

Xu, Z.J., Gu, Y., Wang, C.Z., Jin, Y., Wen, X.M., Ma, J.C., Tang, L.J., Mao, Z.W., Qian, J., & Lin, J. (2020). The M2 macrophage marker CD206: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology* **9**.

Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., et al. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* **40**, 274–288.

Yang, B.L., Long, Y.Y., Lei, Q., et al. (2024). Lethal pulmonary thromboembolism in mice induced by intravenous human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived large extracellular vesicles in a dose- and tissue factor-dependent manner. *Acta Pharmacologica Sinica* **45**, 2300-2312

*Yang, Y., Lee, E.H., & Yang, Z. (2022). Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **28**, 966–977.

Yao, Y., Fan, X.L., Jiang, D., Zhang, Y., Li, X., Xu, Z. Bin, Fang, S. Bin, Chiu, S., Tse, H.F., Lian, Q., & Fu, Q.L. (2018). Connexin 43-Mediated Mitochondrial Transfer of iPSC-MSCs Alleviates Asthma Inflammation. *Stem Cell Reports* **11**, 1120–1135.

Yuan, Y., Yuan, L., Li, L., Liu, F., Liu, J., Chen, Y., Cheng, J., & Lu, Y. (2021). Mitochondrial Transfer from Mesenchymal Stem Cells to Macrophages Restricts Inflammation and Alleviates Kidney Injury in Diabetic Nephropathy Mice via PGC-1 α Activation. *Stem Cells* **39**, 913–928.

Zhai, S., Zhang, X., Jiang, M., Liu, Y., Qu, G., Cui, X., Hirschbiegel, C.M., Liu, Y., Alves, C., Lee, Y.W., Jiang, G., Yan, B., & Rotello, V.M. (2024). Nanoparticles with intermediate hydrophobicity polarize macrophages to plaque-specific Mox phenotype via Nrf2 and HO-1 activation. *J Hazard Mater* **466**, 133590.

Zhang, Y., Zou, J., & Chen, R. (2022). An M0 macrophage-related prognostic model for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **22**, 1–13.

Zhao, D., Yang, F., Wang, Y., Li, S., Li, Y., Hou, F., Yang, W., Liu, D., Tao, Y., Li, Q., Wang, J., He, F., & Tang, L. (2022). ALK1 signaling is required for the homeostasis of Kupffer cells and prevention of bacterial infection. *The Journal of Clinical Investigation* **132**.

Zhou, C., Lei, F., Mittermaier, M., Ksander, B., Dana, R., Dohlman, C.H., Vavvas, D.G., Chodosh, J., & Paschalis, E.I. (2023). Opposing Roles of Blood-Borne Monocytes and Tissue-Resident Macrophages in Limbal Stem Cell Damage after Ocular Injury. *Cells* **12**, 2089.

Zhou, K., Guo, S., Tong, S., Sun, Q., Li, F., Zhang, X., Qiao, Y., & Liang, G. (2018). Immunosuppression of Human Adipose-Derived Stem Cells on T Cell Subsets via the Reduction of NF-kappaB Activation Mediated by PD-L1/PD-1 and Gal-9/TIM-3 Pathways. *Stem Cells and Development* **27**, 1191–1202.

*reviews jsou označena hvězdičkou

Další použité zdroje:

<https://clinicaltrials.gov>