

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Molekulární biologie a biochemie organismů



Marharyta Kurianova

Zlepšení terapeutických vlastností multipotentních mesenchymálních stromálních buněk
pomocí cytokinového primingu a 3D kultivace

Improvement of therapeutic properties of multipotent mesenchymal stromal cells by cytokine
priming and 3D culture

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: Dr. Yuriy Petrenko, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jarmila Havelková

Praha 2025

Poděkování patří mému školiteli Dr. Yuriyu Petrenkovi, Ph.D., za pomoc a cenné rady při psaní této práce a konzultantce Mgr. Jarmile Havelkové za trpělivost a za kontrolu české gramatiky a stylu textu. Zároveň bych chtěla poděkovat svému příteli Matěji Lachmanovi za podporu a rady při psaní této práce a ZSU, za to, že jsem měla možnost ji napsat.

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: Zlepšení terapeutických vlastností mesenchymálních stromálních buněk pomocí cytokinového primingu a 3D kultivace jsem vypracovala sama s použitím uvedené literatury a na základě konzultaci s vedoucím a konzultantem bakalářské práce.

Také prohlašuji, že jsem využila nástroje umělé inteligence ChatGPT 4.0 (AI) v souladu s opatřením děkana č. 13/2023, článkem 4.3. Konkrétně byly tyto nástroje použity jako podpůrný nástroj při překladu jednotlivých výrazů ze zahraniční literatury. Prohlašuji, že nástroje AI nebyly použity k vyhodnocení a interpretaci získaných dat, a ani k vytvoření výstupů této bakalářské práce.

Praha 2025

Abstrakt

Multipotentní mesenchymální stromální buňky (MSC) jsou široce využívány v regenerativní medicíně díky své parakrinní aktivitě, imunomodulačním funkcím a diferenciací schopnostem. Cílem této práce je prozkoumat a shrnout možnosti zvýšení terapeutické účinnosti MSC pomocí technik cytokinového primingu a 3D kultivace ve sféroidech. Analýza výhod a nevýhod jednotlivých přístupů poskytne nové pohledy na optimalizaci využití MSC v regenerativní medicíně.

Klíčová slova: MSC, priming, cytokiny, 3D kultury, sféroidy

Abstract

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are widely used in regenerative medicine due to their paracrine activity, immunomodulatory and differentiation properties. This thesis aims to investigate and summarize the potential enhancement of MSC therapeutic efficacy through cytokine priming and 3D culture techniques. The analysis of the benefits and drawbacks of each of these approaches will offer new insights into the optimization of the application of MSCs in regenerative medicine.

Keywords: MSC, priming, cytokines, 3D cultures, spheroids

Obsah

1. Úvod	4
1.1. Charakteristika a zdroje multipotentních mesenchymálních stromálních buněk	4
1.2. Terapeutický potenciál a léčebné využití MSC	5
1.3. Výzvy terapeutického využití MSC	6
1.4. Výhody primingu MSC	8
2. Priming cytokiny	9
2.1. Priming pomocí interferonu γ (IFN- γ)	10
2.2. Priming pomocí faktoru nádorové nekrózy α (TNF- α)	12
2.3. Priming pomocí interleukinu 17 (IL-17)	13
2.4. Kombinace cytokinů	14
3. Priming 3D kultur ve sféroidech	16
4. Porovnání primingu MSC cytokiny a 3D kultur	20
4.1. Priming cytokiny shrnutí	20
4.2. Priming 3D kultur shrnutí	20
4.3. Komplementární účinky primingu	21
5. Závěr	22
6. Literatura	23

1. Úvod

Prvním, kdo objevil, že jsou buňky podobné fibroblastům, původem z kostní dřeně, schopné chondrogenese v adhezivní kultuře, byl Alexander Friedenstein (Friedenstein & Kuralesova, 1971). Později byly prokázány schopnosti diferenciaci těchto buněk i do řady dalších typů buněk pojivových tkání, což vedlo k uznání jejich role jako mesenchymálních kmenových buněk. A. I. Caplan, byl prvním, kdo zavedl tento pojem (Caplan, 1994). V dnešní době jsou mesenchymální kmenové/stromální buňky typicky definovány jako adherentní buňky podobné fibroblastům, které jsou schopné *in vitro* diferenciaci na osteoblasty, chondroblasty a adipocyty.

Původně byly MSC izolovány z kostní dřeně (BM-MS), a právě tyto buňky, popsané Friedensteinem, dodnes zůstávají nejčastěji volbou pro použití v buněčné terapii. První terapeutické využití MSC bylo popsáno H. Lazarem v roce 1995 (Lazarus et al., 1995), kdy bylo experimentálně prokázáno, že mesenchymální buňky, odvozené z lidské kostní dřeně pacientů s rakovinou, lze bezpečně izolovat, expandovat *in vitro*, a podávat intravenózní infuzí bez nežádoucích toxických účinků. Nicméně, nejdříve byly MSC považovány za progenitorové buňky kostní dřeně, a jejich diferenciaci za hlavní funkci. Později došlo ke změně paradigma, a odhalilo se, že klíčovou součástí jejich léčebných účinků není diferenciaci ale spíše parakrinní aktivita (Caplan, 2017).

1.1. Charakteristika a zdroje multipotentních mesenchymálních stromálních buněk

Pojmy mesenchymální kmenové/stromální buňky, mají zavádějící zkratku MSC, která platí pro oba názvy, proto tyto pojmy často bývají přirovnány nebo substituovány jeden druhým. Existují, však určité rozdíly mezi výše uvedenými koncepty, ačkoliv jde o ty samé buňky. Z toho důvodu Internacionální společnosti buněčných terapeutů (ISCT) byly publikovány přesné definice, vyznačující multipotentní mesenchymální stromální buňky (MSC) s podmínkou, že mají další charakteristiky (Dominici et al., 2006; Horwitz & Keating, 2000):

- Adherence k plastu v standardních kultivačních podmínkách za použití kultivační lahve;
- Expres specifických povrchových antigenů (*CD90*, *CD73* a *CD105*);
- Minimální exprese ($\leq 2\%$ buněk) *CD14* nebo *CD11b*, *CD45*, *CD34*, *CD79a* nebo *CD19* a *HLA* třídy II (*HLA-DR*);
- Schopnost diferenciaci do adipocytů, osteoblastů a chondroblastů za standardních podmínek *in vitro* diferenciaci.

Charakteristiky MSC jsou výrazně ovlivněny původem buněk. Mesenchymální stromální buňky lze izolovat z různých zdrojů (kostní nebo zubní dřev, tuková tkán, kůže, periferní nebo pupečnicková krev, placenta, Wharton's jelly a jiné). Dále budou uvedeny tři nejčastější z nich:

- 1) Kostní dřev (BM) je původním a dosud hlavním zdrojem izolace MSC. Metody odběru MSC z kostní dřeně jsou, však vysoce invazivní, a bylo prokázáno, že diferenciacní schopnost, počet, a maximální délka života buněk klesá se zvyšujícím se věkem dárce (Mueller & Glowacki, 2001; Stenderup et al., 2003).
- 2) Tuková tkán (AT), je jedním z alternativních zdrojů, které lze získat méně invazivní metodou, a ve větším množství než z BM. Bylo prokázáno, že AT obsahuje multipotentní buňky, které mají podobné charakteristiky jako MSC izolované z kostní dřeně (BM-MS)

- (Zuk et al., 2002). Velkou výhodou je možnost získání těchto buněk ve velkém počtu z kosmetických liposukcí, a snadné pěstování za standardních podmínek tkáňové kultury.
- Wharton's jelly (WJ) z pupečnickové šňůry je dalším alternativním zdrojem MSC. Výhodami tohoto zdroje MSC jsou malá invazivita metody odběru (pupeční šňůra se odebírá po porodu) a absence etických výhrad, jelikož je proces extrakce bezbolestný, a pro matku a novorozence absolutně bezpečný. Tyto buňky mají vynikající proliferační potenciál a mohou si, ve srovnání s dospělými MSC z kostní dřeně nebo tukové tkáně, zachovat svou multipotenci pro více pasáží *in vitro*.

MSC z různých zdrojů se liší expresí markerů *CD34*, *CD133*, *CD146*, *MSCA-1* a *SSEA-4*. Například, MSC izolované z tukové tkáně (AT-MS) mají nejvyšší expresi *CD34*, BM-MS – *CD133* (Petrenko et al., 2020). Exprese genu pro protein *CD146*, který hraje podstatnou roli v adhezi a vaskularizaci, je pozorována u 30 % WJ-MS, ale jen u 5 % BM-MS a AT-MS. Dále také, embryonální marker, jako je například *SSEA-4* je přítomen u 60 % BM-MS a pouze u 10 % AT-MS (Petrenko et al., 2020) Produkce různých proteinů se rovněž může lišit podle metody kultivace, což bude přehledně popsáno dále v této práci (viz „Priming cytokiny“ a „Priming 3D kultivací ve sféroidech“).

Obecně platí, že ve srovnání s MSC z jiných zdrojů, mají MSC z placenty a WJ-MS více diverzní proteom a vyšší diferenciační potenciál (Shin et al., 2021).

Každý ze zdrojů izolace MSC má své specifika, proto je důležité již během plánování výzkumu zvážit, který typ MSC je pro konkrétní účely vhodný.

1.2. Terapeutický potenciál a léčebné využití MSC

Diferenciační potenciál MSC *in vitro* svědčí o možnosti jejich využití k terapeutickým účelům (regeneraci tkání). Přesto, diferenciační schopnost buněk *in vivo* a jejich příspěvek k regeneraci tkání zůstává nezcela objasněn. Navzdory nejasnostem vyskytujícím se kolem využití diferenciačního potenciálu MSC *in vivo*, regenerační účinky jejich parakrinní aktivity byly jednoznačně prokázány v řadě studií (Behm et al., 2024; Hwang et al., 2016; Iso et al., 2007).

Jedním ze způsobů komunikace MSC s jinými buňkami je přímý buněčný kontakt (juxtakrinní komunikace). Pro tento typ komunikace buňky využívají řadu mechanismů, většinou založených na výskytu určitého ligandu na membráně jedné buňky, a receptoru pro tento ligand na membráně druhé buňky, např: *CD200/CD200R* (Najar et al., 2012), toll-like receptory (TLR) (Opitz et al., 2009), *FASL/FAS* (Akiyama et al., 2012), *EphB/ephrin B* (Nguyen et al., 2013), ligand programované smrti 1 (*PD-L1*) (Augello et al., 2005) a molekuly negativní ko-stimulace *B7-H4* (Xue et al., 2010). Prostřednictvím výše uvedených molekul jsou MSC schopny přímým kontaktem modulovat funkce okolních buněk (např. T-lymfocytů).

Řada studií rovněž prokázala, že MSC ovlivňují funkce jiných buněk pomocí nepřímé komunikace (parakrinní). Tuto komunikaci zajišťují parakrinní faktory, jako jsou: cytokiny, růstové faktory a miRNAs, umožňující MSCs přispívat k regeneraci poškozených tkání prostřednictvím vytvoření vhodného mikroprostředí. Hrají tak velkou roli například v imunomodulaci (Song et al., 2020)* (Luz-Crawford et al., 2016), regeneraci tkání (Tang et al., 2011; Wang et al., 2012), angiogenezi (Kwon et al., 2014), anti-fibróze (Hu et al., 2019; Liu et al., 2018) a anti-apoptóze (Faezi et al., 2018).

Parakrinní faktory mohou být také přenášeny v extracelulárních váčcích. Využití z MSC odvozených extracelulárních váčků, jako jsou exosómy, microvezikuly, a apoptotické tělíška, obsahujících parakrinní faktory, je jednou z nebuněčných alternativ léčby na bázi MSC. Velikost a obsah váčků je velmi heterogenní. Obsahují zejména bílkoviny, ale i mRNA a miRNA (Raposo & Stahl, 2019) *, což činí definici jejich příspěvku k regeneraci obtížnou.

Dalším způsobem komunikace mezi MSC a okolními buňkami je horizontální mitochondriální transfer (předávání mitochondrii mezi buňkami), který je uskutečněn pomocí formování tunelových/membranových nanotubic (TNT) mezi MSCs a poškozenými buňkami (Rustom et al., 2004). Pozitivní efekt transferu mitochondrií byl prokázán ve výzkumu Achmada Tanmeera na alveolárním epitelu (Ahmad et al., 2014), a mnoha dalších studiích (Pasquier et al., 2013; Spees et al., 2005; Vallabhaneni et al., 2012).

Po zjištění hlavní podstaty terapeutického potenciálu (parakrinní aktivity), začaly se více zkoumat imunomodulační a regenerační funkce MSC, a nakonec padl hlavní důraz na jejich sekretem a parakrinní interakce mezi MSC, imunitními buňkami a buňkami poškozené tkáně. Následovalo mnoho klinických studií s využitím přípravků obsahujících MSC nebo jimi vyloučenými látkami, a v různých stádiích testování byly pozorovány odlišné výsledky. Přípravky, ukazující dostačující výsledky pro schválení v první až druhé fázi klinických testů většinou nezvládaly překonat třetí. Některé z nich však úspěšně prošly klinickým testováním, a po schválení zdravotnickou komisí EU vyšly na trh. Příkladem je Alofisel z roku 2018, používaný pro terapii Crohnovy choroby u dospělých pacientů. Časem však Evropská léková agentura (EMA) provedla opakované testování, které nakonec neprokázalo jeho efektivitu ve srovnání s placebem. Preparát byl následně stažen z trhu Evropské Unie v roce 2024 ([URL1](#)). Ačkoliv se po svém objevení zdály MSC vhodné pro terapii, v dnešní době je schváleno jen malé množství preparátů. Dále jsou shrnuté možný příčiny komplikací, které mohou znemožnit či zpomalit schválení MSC pro léčbu.

1.3. Výzvy terapeutického využití MSC

Příprava většiny MSC terapeutik zahrnuje expanzi buněk *ex vivo*, kryogenní skladování/prezervaci, rozmrazování uložených MSC a jejich podávání pacientovi.

Každá z těchto fází má svoje variace, které mohou, více či méně, ovlivňovat efektivitu působení MSC na organismus, což je důvodem heterogenity výsledků a komplikací posouzení účinnosti terapie. Výzvy, spojené s variabilními výsledky MSC terapií, se dají rozdělit do třech hlavních skupin: problémy vyplývající z kultivace MSC, problémy spojené s uvedením buněk do organismu, a odpověď recipienta.

V souvislosti s kultivací buněk lze hovořit o různých zdrojích (dárce, tkáně), způsobech izolace a uchování buněk, a rovněž o tom, jak dlouho, a jakým způsobem byly buňky kultivovány (medium, kultivační láhev/bioreaktor, 2D/3D kultury). Variace každého procesu zanechává stopu na finální terapeutické účinnosti MSC (Yin et al., 2019)*. V současnosti je ke každé studii vyžadován detailní popis celého procesu kultivace buněk. Integrace přesně definovaných laboratorních technik může zajistit standardizaci buněčných kultur určených pro pozdější terapeutické podání, a umožní tak jejich masovou produkci.

Po dostatečné expanzi buněk, mohou MSC být kryoprezervovány. Efektivní, tedy správně zvolená metoda kryoprezervace by neměla ovlivňovat terapeutické účinky buněk.

V současnosti jsou však možnosti kryoprezervačních metod omezené, a vyžadují precizní hodnocení biologické bezpečnosti před použitím. Nevhodná nebo chybná kryoprezervace může vést ke ztrátě diferenciačního potenciálu a terapeutických účinků buněk, toxicitě, poškození, nebo dokonce k senescenci a smrti buněk (Gil-Chinchilla et al., 2024; Wang & Li, 2024).

V okamžik, kdy jsou buňky připravené k uvedení do organismu recipienta, se setkáváme s dalšími problémy. Chování MSC, včetně jejich biologických vlastností, mohou být ovlivněny způsobem podání buněk. Konkrétní faktory, jako je místo vpichu, vlastnosti injekčního zařízení, a vlastnosti materiálů nosiče/pufry, mají vliv na potenci buněk (Antunes et al., 2014).

Následujícím kritickým krokem je navádění (tzv. homing) MSC. V roce 2017, F. Nitzsche poprvé definoval 2 druhy homingu: nesystemický a systemický (Nitzsche et al., 2017). Při nesystemickém homingu jsou buňky implantovány lokálně do cílové tkáně. K systemickému homingu dochází naopak až poté, co byly buňky intravenózně vpraveny do organismu recipienta. Proces homingu je pak definován jako zastavení buněk v krevním řečišti, s následnou transmigrací přes endotel do cílové tkáně. Hlavními kroky systemického homingu, podobně jako u leukocytů, jsou: zachycení a rolování, aktivace, arest, transmigrace a migrace (Sackstein, 2005).

Již na začátku tohoto století byla popsána řada komplikací, které se objevují během homingu MSC (Barbash et al., 2003; Devine et al., 2001). Mezi nimi patří:

- 1) Nízká efektivita usazení (engraftmentu) – po aplikaci se pouze malá část MSC úspěšně dostane do poškozeného místa, a ještě menší počet zde dlouhodobě setrvá (Devine et al., 2001);
- 2) Zachycení v plicním řečišti – MSC mají, kvůli své velikosti a interakcím s endotelem, tendenci se hromadit v plicních kapilárách, což snižuje jejich dostupnost v cílových tkáních (Wang et al., 2015);
- 3) Odpověď MSC na chemotaktické signály a migrační schopnost nejsou tak robustní jako u výše uvedených leukocytů (Shi et al., 2010).

Přítomnost MSC v cílové tkáni však vyvolává další komplikace v podobě imunitního systému recipienta, který může spustit bouřlivou reakci na tyto buňky a jimi produkované molekuly.

U zrodu myšlenky transplantace MSC, jako druhu buněčné terapie, hrála roli hypotéza, že buňky mají „imunitní privilegium“, které jim dovoluje být uvedeny do organismu recipienta bez následného tzv. odmítnutí hostitelským imunitním systémem. Tento koncept by dovolil masovou produkci MSC za velmi malého množství dárců. Nicméně, většina preklinická data, která podporovala tuto hypotézu, byla získána na myších modelech za zkoumání účinnosti buněk se syngenním, tedy shodným, hlavním histokompatibilním komplexem (MHC), což samo o sobě činí odmítnutí cizorodých buněk málo pravděpodobným.

Následně bylo prokázáno, že MSC, stejně jako všechny somatické buňky, konstitutivně produkují molekuly MHC třídy I (MHCI), a mají schopnost produkovat MHC třídy II (MHCII), pokud jsou vystaveny zánětlivým signálům (jako je např. interferon- γ) (Chan et al., 2008).

Další poznatky ukazují, že lidské mesenchymální kmenové buňky, které projdou replikativním vyčerpáním (tzv. senescencí), ztrácejí část své schopnosti regulovat zánětlivé procesy (Sepúlveda et al., 2014), což může vést ke snížení jejich terapeutického potenciálu.

Dalším krokem v přípravě MSC (před aplikací recipientovi) je kryoprezervace buněk, a jejich rozmrazení před aplikací. Mimo již dříve zmíněných komplikací, může mít aplikace buněk bezprostředně po rozmrazení nižší terapeutický účinek než aplikace buněk, co kryoprezervaci a následnému rozmrazení nepodlehly.

Mimo imunitní odpovědi hostitele a negativního vlivu kryoprezervace se dalším problémem mohou stát nepříznivé podmínky dlouhodobé buněčné kultivace. Pro buňky pěstované ve 2D monovrstvě s přebytkem O₂ v okolí, může být obtížné se adaptovat na hypoxické trojrozměrné prostředí tkání, což může rovněž ovlivnit jejich životaschopnost a schopnost homingu.

Je zřejmé, že pro rozvoj MSC terapií je třeba se vypořádat s výše uvedenými a mnoha dalšími výzvami. Od počátku výzkumu terapeutických účinků MSC bylo objeveno několik metod optimalizace a modifikace stavu a funkcí MSC. Mezi ně patří, mimo jiné, *in vitro* priming (preconditioning). Následující text práce bude věnován právě tomuto tématu.

1.4. Výhody primingu MSC

Pro modulaci aktivity a funkcí MSC byla vyvinuta řada strategií. Tyto strategie můžeme rozdělit na dvě skupiny: intracelulární a extracelulární inženýrství. Intracelulární inženýrství spočívá v genetické modifikaci buněk. Principem extracelulárního inženýrství je optimalizace podmínek, ve kterých je kultura pěstována. Působení na buněčnou aktivitu prostřednictvím vnějších faktorů pomáhá se vyhnout riziku, které představuje zásah do genomu buněk, jež často vede k mutacím. Pro priming (licencování, stimulaci) patřící do druhé skupiny byla vyvinuta řada různých metod. Některé druhy primingu, jako jsou např. hypoxie a 3D kultivace, jsou zaměřené na úpravu kultivačního prostředí buněk tak aby napodobovalo přirozené prostředí lidského organismu (omezení přístupu kyslíku nebo trojrozměrný růst umožňují MSC vytvářet extracelulární matrix (ECM) a, poskytují větší plochu pro adhezi a mezibuněčné interakce), což snižuje stres a míru úmrtí buněk po aplikaci do organismu (Hu & Li, 2018; Noronha et al., 2019)*. Jiné druhy primingu, jako je aplikace cytokinů nebo malých molekul, naopak působí na buňky s cílem spustit v nich specifické procesy (odpověď na zánět, změnu metabolických drah, aj.) (Hu & Li, 2018; Noronha et al., 2019)*. Takový způsob primingu MSC dovoluje posílení a modulaci jejich terapeutických schopností pro konkrétní účely.

2. Priming cytokiny

Interakce mezi růstovým faktorem a jeho receptory aktivuje signální kaskádu, která signalizuje ve prospěch přežití buněk a jejich diferenciaci, proto může priming růstovými faktory a cytokiny ovlivnit hostitelskou tkáň prostřednictvím parakrinních/autokrinních drah. MSC sekretují různé trofické faktory a cytokiny s velkou diverzitou biologických funkcí, včetně imunomodulačních vlastností (Song et al., 2020)* a podporou protizánětlivých procesů (Prockop & Oh, 2012)*.

Důležitou vlastností MSC pro terapii je, že v podmínkách homeostázy je hladina MHCII a kostimulačních molekul (CD40, CD80, and CD86) velmi nízká, až nedetekovatelná (Dominici et al., 2006). Existuje přesvědčení, že právě díky tomu, za podmínek homeostázy, jsou buňky vhodné pro allogenní transplantaci. Vyskytují se však rovněž studie, které toto přesvědčení zpochybňují (Ankrum et al., 2014; Oliveira et al., 2017; Schu et al., 2012).

Za zánětlivých podmínek, tzn. za přítomnosti prozánětlivých cytokinů (např. interferon- γ (IFN- γ), faktoru nádorové nekrózy α (TNF- α), interleukin-17 (IL-17) a interleukin-1 β (IL-1 β)) dochází k výraznému zvýšení exprese genů pro MHCII a kostimulační molekuly (Shi et al., 2012)*. Buňky v takovém stavu jsou nazývány aktivované/stimulované/primované, a zůstávají vhodné pro použití v terapii díky tomu, že efektivněji potlačují imunní odpověď hostitele.

Výsledky různých studií zabývajících se vlivem zánětlivých podmínek, a to konkrétně prozánětlivých cytokinů (IFN- γ , IL-2 a TNF- α) na MSC si poněkud protirečí. Mnohé studie, ukazují, že za terapeutickým účinkem MSC stojí zřejmě jejich schopnost imunoprese, která může zvýšit pravděpodobnost a dobu přežití graftu cizorodé tkáně po transplantaci do organismu hostitele (Bartholomew et al., 2002; Casiraghi et al., 2008; Huang et al., 2013). V rozporu s těmito studiemi, se však vyskytují studie ukazující opačné výsledky, kde MSC vykazaly minimální účinek, který nestačil k zabránění odmítnutí štěpu, nebo došlo pouze ke krátkodobému zabránění, po němž byl štěp rovněž odmítnut (Chabannes et al., 2007), někdy mohl jejich účinek dokonce k odmítnutí přispět (Inoue et al., 2006).

P. Renner et al. ve svém výzkumu na myších srdečních transplantátech ukázal, že vysoké hladiny cytokinů indukují imunopresivní účinky MSC. Nízké koncentrace cytokinů naopak málo ovlivňují imunopresivní vlastnosti buněk, a mohou dokonce spustit opačné (prozánětlivé) funkce MSC (Renner et al., 2009). Zvýšení produkce MHCII buňkami vyžaduje nízkou koncentraci IFN- γ (<25 pg/ml). V takovém stavu MSC jsou schopny posilnit imunitní odpověď spuštěné adaptivní imunity (T-lymfocyty), což může podpořit odmítnutí cizorodé tkáně. Když koncentrace IFN- γ přesáhne 25 pg/ml, MSC potlačují produkci MHCII, a vykazují imunopresivní funkce (Chan et al., 2006).

V jiné studii W. Ling et al. ukázali, že během zánětu je produkce ligandu programované smrti 1 (PD-L1), indoleamin 2,3-dioxygenázy (IDO, enzym řídící metabolismus L-tryptofanu) a interleukinu 6 (IL-6) v MSC silně zvýšená (Ling et al., 2014). Každý z výše uvedených proteinů má imunomodulační funkci, která je součástí kontroly imunitní odpovědi. Účelem této kontrolní reakce je zabránit autoimunním poškození nebo převést zánět z akutní fáze do chronické, což zeslabí imunní odpověď.

I za nepřítomnosti zánětlivých faktorů vykazují MSC nadále imunoregulační vlastnosti, konkrétně: zvyšují míru přežití B-lymfocytů (Franquesa et al., 2015) a zabraňují spuštění apoptózy T-lymfocytů (Normanton et al., 2014).

Z dostupných studií lze usoudit, že účinky různých cytokinů na MSC mohou být velmi různorodé, a v některých případech úplně opačné. Z tohoto důvodu je důležité mít dobrý přehled o mechanismech a důsledcích stimulace MSC daným faktorem/cytokinem. Následující podkapitoly budou věnovány konkrétním účinkům, nejčastěji v praxi využívaných cytokinů.

2.1. Priming pomocí interferonu γ (IFN- γ)

IFN- γ hraje zásadní roli jak v přirozené, tak v adaptivní imunitní odpovědi. Přirozeně je produkován T-pomocnými buňkami typu 1 (Th1), cytotoxickými T-lymfocyty (CTL nebo CD8+), NK buňkami (tzv Natural Killers, buňky vrozené imunity, funkčně podobné cytotoxickým T-lymfocytům) a přirozenými lymfoidními buňkami (ILC). Biologické funkce IFN- γ zahrnují antivirovou obranu, imunomodulaci a protinádorovou aktivitu, a to prostřednictvím spouštění proteinových signalizačních kaskád, začínajících z povrchovým proteinem INFGR (receptoru pro IFN- γ). Mezi výsledné efekty těchto kaskád patří takové procesy jako je např. aktivace makrofágů, zvýšení produkce molekul MHC, a indukce antimikrobiálních enzymů, například oxidu dusnatého (iNOS).

IFN- γ je považován za jeden z nejdůležitějších aktivátorů imunomodulačních schopností MSC. Prvním, kdo navrhl a prokázal možnost použití IFN- γ pro priming MSC, byl M. Krampera a jeho kolegové, jejichž výzkum ukázal, že MSC mají antiproliferační účinek na buňky imunního systému (hlavně T-lymfocyty a NK buňky), který však nebyl spojen se změnami v expresi aktivačních markerů, indukci apoptózy, ani s modulací aktivity regulatorních T-lymfocytů (Treg). Imunosupresivní aktivita MSC nebyla podmíněna přímým buněčným kontaktem, ale vyžadovala přítomnost IFN- γ , produkováného aktivovanými CTL a NK buňkami. Rovněž B-lymfocyty, v reakci na IFN- γ , získávají zvýšenou citlivost k inhibičnímu působení primovaných MSC. Mechanismy, jimiž MSC přímo ovlivňují funkci B-lymfocytů, dosud nejsou zcela objasněny. Pozorovaný účinek byl zprostředkován schopností IFN- γ indukovat v MSC expresi enzymuIDO, který následně potlačoval proliferaci aktivovaných T a NK buněk (Krampera et al., 2006).

Dále tato studie ukázala, že k inhibici proliferace T-lymfocytů dochází po třech dnech od přidání INF- γ . Tyto výsledky naznačují, že pro navození imunosupresivního účinku MSC je nezbytná vzájemná interakce mezi MSC a cílovými buňkami během počáteční fáze kultivace (Krampera et al., 2006).

Pozdější studie také prokázaly, že indukce exprese genu kodujícíhoIDO v MSC pomocí INF- γ vede k řadě dalších změn:

- Malé zvýšení produkce cyklooxygenázy (COX-1,2), což je enzym zajišťující syntézu PGE2 z kyseliny arachidonové a následné zvýšení hladiny prostaglandinu-E2 (PGE2) (English et al., 2007), který inhibuje proliferaci T-lymfocytů, indukuje syntézu IL-10 a redukuje produkci INF- α , IL-12, IL-1 β , a IL-8 (protizánětlivé cytokiny) v makrofázích;
- Zvýšení produkce HGF, který podporuje angiogenezi (English et al., 2007);
- Indukce exprese genu pro transformující růstový faktor β (TGF- β) (English et al., 2007; Ryan et al., 2007), který se společně s transkripčním faktorem FOXP3 podporuje

diferenciaci T-lymfocyty do Treg (Fu et al., 2004); a v kombinaci s IL-6 a IL-21 se podílí na diferenciaci T-lymfocytů na Th17 (Kimura et al., 2007; Yang et al., 2008), což, v obou případech, vede k potlačení zánětu, anebo dokonce k imunosupresi.

- Zvýšení produkce cytokinu CCL2, které následně potlačuje imunitní odpověď zprostředkovanou Th1, Th2 a Th17 lymfocyty (Rafei et al., 2009).
- Indukce exprese genu pro PD-L1 (nikoliv PD1 nebo PD-L2) (English et al., 2007), který způsobuje blokaci aktivace T-lymfocytů.

Všechny zmíněné procesy vedou k potlačení zánětu a oslabení imunitní odpovědi, což činí IDO velmi účinným imunosupresivním faktorem.

Některé studie však uvádí odlišná data ohledně množství IL-10 (inhibitoru buněčné imunity) detekovaného v kultuře MSC po vystavení působení IFN- γ . V některých studiích nebyla pozorována konstitutivní exprese genu zodpovědného za produkci IL-10, a po stimulaci INF- γ docházelo ke změnám koncentrace proteinu (English et al., 2007; Krampera et al., 2003). Jiné studie naopak uvádí zvýšení detekovaného IL-10 (Beyth et al., 2005; Rasmusson et al., 2005). Pozdější studie ukázaly, že priming IFN- γ má komplexní vliv na expresi a produkci IL-10. C. Dunn a kolegové ve své studii prokázali, že IFN- γ významně zvyšuje expresi mRNA kódující IL-10 v MSC v závislosti na dávce a délce expozice INF- γ . Nejvyšší nárůst byl pozorován při působení 25 ng/ml IFN- γ po dobu 48 hodin (Dunn et al., 2022). Navzdory zvýšené genové expresi, však zůstává sekrece IL-10 do média/okolí nízká, až nedetekovatelná (Burnham et al., 2023; Dunn et al., 2022). Při tom, nejsilnější imunosupresivní účinky, paradoxně, korelují s nejnižší hladinou IL-10. Tyto poznatky vedou k závěru, že IL-10 není klíčovým mediátorem imunomodulačních funkcí MSC stimulovaných INF- γ .

Bylo prokázáno, že zvýšená produkce IDO a PGE2 u MSC, předběžně stimulovaných IFN- γ , pomáhá buňkám efektivněji potlačovat aktivaci NK buněk, než to dělají MSC, které nebyly stimulovány. Parakrinní účinek stimulovaných MSC způsobuje inhibici syntézy IFN- γ NK buňkami a snížení produkce aktivačního ligandu NKG2D (který spouští cytotoxické funkce NK buněk) na povrchu (Noone et al., 2013). Zabránění aktivace NK buněk vede k zeslabení imunní odpovědi zprostředkované vrozenou buněčnou imunitou.

Řada studií také uvádí, že priming pomocí IFN- γ přispívá ke zvýšení exprese genových komplexů *HLA* třídy I (*HLA-ABC*) a II (*HLA-DR*), které kódují proteiny pro MHC I a MHC II. Tento jev může zvyšovat riziko odmítnutí při alogenní transplantaci (English et al., 2007; Noone et al., 2013; Rafei et al., 2009).

E. Szabó a kolegové paralelně studovali šest monokultur MSC po stimulaci pomocí IFN- γ a TNF- α . Tyto buňky byly původně izolovány z jedné myši, ale vykazovaly silně heterogenní aktivitu. Výzkum ukázal, že po stimulaci buněk tyto rozdíly v imunosupresivní aktivitě různých linií zanikají, a inhibiční účinky buněk se sjednotí (Szabó et al., 2015), což poskytlo hypotetický podklad pro využití INF- γ za účelem snížení heterogenity expresního profilu MSC. Priming pomocí IFN- γ tak umožnil sjednocení a snázeš kontrolu i predikci výsledných účinků.

V roce 2017 byl publikován odborný článek, zčásti odhalující genetickou podstatu imunosupresivních účinků myších MSC stimulovaných IFN- γ (Vigo et al., 2017). Autoři prokázali souvislost těchto účinků s časnou fosforylací signálního transduktoru a aktivátoru transkripce (STAT1/STAT3), a rovněž s potlačením aktivity mTOR dráhy. Výsledkem byla zvýšená exprese genů zodpovědných za imunoregulaci, a snížení exprese genů spojených

s diferenciací, proliferací a kmenovostí. U lidských MSC inhibice dráhy mTOR rovněž zvyšuje jejich imunoregulační potenciál (Vigo et al., 2017).

Pozoruhodně, ve studii z roku 2016 bylo dokázáno, že stimulace IFN- γ před kryokonzervací MSC zlepšuje jejich imunoregulační vlastnosti po rozmrazení. Buňky vykazovaly podobnou schopnost inhibovat proliferaci T-lymfocytů a degranulaci (aktivaci) CTL prostřednictvím sekrece IDO, jako před zmrazením. Ve srovnání s nestimulovanými, rozmrazené MSC stimulované IFN- γ byly také méně náchylné k lýze hostitelskými lymfocyty. Navzdory pozitivním účinkům na přežití buněk nebyla stimulace IFN- γ schopná zvrátit defekt homingu, obvykle pozorovaný po rozmrazení (Chinnadurai et al., 2016).

V preklinických studiích se tento typ primingu využívá hlavně pro léčbu reakce štěpu proti hostiteli, (tzn. graft-versus-host disease, GvHD), a to z důvodu toho, že ve srovnání s nestimulovanými MSC, stimulace MSC pomocí INF- γ výrazně zvyšuje míru přežití těchto buněk (Polchert et al., 2008).

A. Burnham a kolegové (Burnham et al., 2023) ve svém výzkumu prokázali, že MSC stimulované IFN- γ mohou představovat účinnější imunomodulační terapii u onemocnění, kde lze léčbu cílit na T buňky (např. u GvHD) ve srovnání s MSC stimulovanými TNF- α nebo MSC, které nepodlehly žádné stimulaci. Tyto buňky však stále mohou představovat vhodnou volbu pro terapii jiných patologických stavů.

Souhrnem dosavadních poznatků lze konstatovat, že priming MSC pomocí IFN- γ má největší vliv na imunomodulační schopnosti buněk, konkrétně: inhibice proliferace (případně degranulaci) CTL a NK buněk a snížení produkci jejich prozánětlivých cytokinů, což vede k potlačení zánětu a imunosupresi. Tento typ primingu se jeví jako nejvíc vhodná volba pro terapii autoimunních onemocnění, způsobených T-lymfocyty nebo NK buňkami. Nicméně, jelikož po stimulaci INF- γ hladina exprese *HLA* obou tříd stoupá, při transplantaci buněk je důležité brát v potaz MHC kompatibilitu recipienta a dárce.

2.2. Priming pomocí faktoru nádorové nekrózy α (TNF- α)

TNF- α je prozánětlivý cytokin, který hraje klíčovou roli v regulaci imunního systému, a odpoví na zánět v jeho akutní fázi. Primárně je v organismu produkován aktivovanými makrofágy, T-lymfocyty, NK buňkami a dalšími imunitními buňkami. TNF- α působí prostřednictvím dvou specifických receptorů, TNF receptor 1 (TNFR1) a TNF receptor 2 (TNFR2), čímž spouští různé buněčné signální dráhy vedoucí k přežití buněk, apoptóze nebo zánětlivé odpovědi. Biologické účinky TNF- α zahrnují obranu proti infekcím a nádorům. Porucha jeho produkce přispívá k rozvoji mnoha autoimunitních a zánětlivých onemocnění, jako je revmatoidní artritida, zánětlivé onemocnění střev a psoriáza.

TNF- α je druhým nejčastějším cytokinem používaným pro stimulaci MSC. Řada účinků, které má priming pomocí TNF- α jsou podobné účinkům IFN- γ (PGE2, IDO, HGF, CD54, a MHCI), ale jeho efekt je ve srovnání s IFN- γ slabší. Z tohoto důvodu se TNF- α častěji používá v kombinaci s jinými cytokiny nebo i jinými způsoby primingu (Prasanna et al., 2010).

G. Ren a kolegové ve své studii zkoumali působení různých cytokinů (jednotlivě a kombinovaně) na MSC, a následně jejich schopnost potlačovat proliferaci T-lymfocytů. Výsledky ukázaly, že IFN- γ je schopen inhibice pouze za přítomnosti TNF- α , IL-1 α nebo IL-1 β . Zároveň, TNF- α , IL-1 α a IL-1 β jsou vzájemně zaměnitelné a žádný z nich samostatně neměl vliv na proliferaci lymfocytů (Ren et al., 2008). Navíc, během výzkumu bylo

pozorováno, že kombinace těchto prozánětlivých cytokinů zvyšuje produkci chemokinů (CXCL9 a CXCL10), které jsou zodpovědné za atrakci imunitních buněk, produkujících CXCR3+ receptory na povrchu (B a T-lymfocyty, dendritické buňky (DC) a NK) (Peperzak et al., 2013; Ren et al., 2008). Tento jev umožňuje MSC efektivnější komunikaci s imunitními buňkami skrze parakrinní faktory nebo přímým kontaktem a navádění více imunitních buněk místa zánětu.

Mimo jiné, ukázalo se, že zvýšení produkce IDO při primingu MSC pomocí obou IFN- γ a TNF- α podporuje specializaci monocytů na makrofágy typu M2 (CD14+/CD206+), které sekretují protizánětlivý cytokin IL-10. Takovým způsobem M2 makrofágy inhibují proliferaci T-lymfocytů, což má imunosupresivní účinek (François et al., 2012). Produkce IDO se snižuje po rozmražení kryoprezervovaných buněk (Rovira Gonzalez et al., 2016). Nicméně, stimulace MSC pomocí IFN- γ a TNF- α indukuje přestavbu promotoru *IDO1*, což koreluje se zvýšením acetylace histonu H3 na lysinu 9 (H3K9) současně s redukcí trimethylace H3K9. Při opakovaném vystavení MSC působení IFN- γ tato modifikace chromatinu zůstává i po kryoprezervaci, což pomáhá rychlému návratu hladiny *IDO1* mRNA po rozmražení buněk (Rovira Gonzalez et al., 2016).

Nicméně, důležitým faktorem je zde variabilita supresivních účinků vůči T-lymfocytům. MSC původem od různých dárců po primingu IFN- γ a TNF- α takovouto variabilitu vykazují, a důvodem je pravděpodobně variabilita míry zvýšení hladiny IDO (François et al., 2012; Szabó et al., 2015). Heterogenita účinků stimulovaných MSC komplikuje predikci výsledku, což hraje negativní roli v kontextu terapie.

Jiná studie demonstrovala, že TNF- α v kombinaci s lipopolysacharidy (LPS) a hypoxií stimuluje MSC k produkci cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF2), a insulin-like růstového faktoru 1 (IGF1, také somatomedin C) (Crisostomo et al., 2008). Uvedené molekuly následně podporují angiogenezi, růst fibroblastů, a regeneraci okolních tkání.

Shrneme-li výše uvedené, docházíme k závěru, že priming MSC pomocí TNF- α je výhodnější v kombinaci s jinými cytokiny, proto je nejčastěji využíván společně s IFN- γ . TNF- α zesiluje účinky IFN- γ , které byly uvedeny v předchozí podkapitole, tím, že způsobuje atrakci lymfocytů a zvýšení množství makrofágů, inhibujících proliferaci buněk adaptivní imunity.

2.3. Priming pomocí interleukinu 17 (IL-17)

Dalším, často pro priming MSC používaným cytokinem, je interleukin 17 (IL-17). Tento prozánětlivý cytokin hraje klíčovou roli v obraně hostitele proti extracelulárním patogenům a v patogenezi různých zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Primárně je produkován specializovanou subpopulací T buněk (Th17), ale také $\gamma\delta$ T buňkami, přirozenými lymfoidními buňkami a neutrofily. IL-17 působí prostřednictvím receptorového komplexu IL-17 (IL-17RA/IL-17RC), který následně aktivuje signální dráhy jako NF- κ B a MAPK, vedoucí k produkci prozánětlivých mediátorů, včetně cytokinů, chemokinů a antimikrobiálních peptidů (Chang & Dong, 2009)*. Jeho biologické funkce zahrnují aktivaci neutrofilů, posílení imunitní bariery a převod zánětu z akutní fáze do chronické.

MSC mají na povrchu velké množství IL-17A (nejaktivnější z izoform IL-17) receptorů, což dalo hypotetický podklad možnosti stimulace buněk tímto cytokinem. IL-17A je známý také

tím, že funguje jako růstový faktor MSC, působící přes signální kaskády AKT, ERK, MEK a p38 (Park et al., 2005).

K. N. Sivanathan a jeho kolegové se v roce 2015 jako jedni z prvních pokusili stimulovat MSC pomocí IL-17 a ukázali, že na rozdíl od INF- γ primingu, zde dochází ke zvýšení míry proliferace buněk, nemění při tom jejich morfolonii nebo expresi povrchových markerů (např. PD-L1). Navíc, priming neovlivnil hladiny MHC I a II, což znamená, že MSC si po vystavení IL-17 zanechávají své hypoimmunogenní schopnosti (málo aktivují imunitu) (Sivanathan et al., 2015). Studie také ukázala, že po stimulaci IL-17, podobně jako v případě INF- γ , začínají buňky podporovat diferenciaci CD3⁺ T-lymfocytů na Treg (místo CTL). Podmínkami, potřebnými pro přeměnu CD3⁺ T buňky na Treg, jsou juxtakrinní indukce a vysoké hladiny TGF- β 1 a PGE2. Zároveň po vystavení IL-17 MSC zvyšují produkci IL-6, bez toho, aby změnil hladinu IDO1, COX-1 nebo TGF- β 1 (Baratelli et al., 2005; Chen et al., 2003; English et al., 2009).

Současně se zvýšením množství Treg buněk bylo pozorováno snížení hladiny IL-2, a to v případě jak IL-17 stimulovaných, tak INF- γ stimulovaných kulturách. Regulatorní T buňky neprodukují IL-2, ale produkují vysoké hladiny receptoru IL-2R (CD25), který je zodpovědný za jejich přežití a indukci proliferace cytotoxických T-lymfocytů (Sivanathan et al., 2015). Tímto způsobem, tedy snížením hladiny IL-2 v kultuře, MSC buňky nepřímo inhibují proliferaci CTL.

Studie H. Huang a kolegů ukázala, že priming IL-17 způsobuje zvýšení migrace, motility a diferenciaci MSC do osteoblastů (Huang et al., 2009). Výsledky různých studií na toto téma se však často velmi liší. Studie, využívající lidské MSC, uvádí, že IL-17 stimuluje osteogenní a inhibuje adipogenní diferenciaci MSC prostřednictvím zvýšené produkce IL-6 a IL-8 (Huang et al., 2009; Noh, 2012), které se účastní procesu diferenciaci (Shin et al., 2009). Nicméně, výzkum prováděný na myších modelech ukazuje opačné výsledky: priming IL-17 způsobuje potlačení osteogenní diferenciaci MSC pomocí I κ B kinázy a jaderného faktoru kappa B (NF κ B) (Chang et al., 2013). Co se týče chondrogenní diferenciaci, následná studie ukázala, že priming inhibuje protein kinázu A (PAK), s následným snížením míry fosforylace transkripčního faktoru SOX9, který se účastní formování chrupavky. Takovým způsobem bylo prokázáno, že IL-17 inhibuje chondrogenní diferenciaci (Kondo et al., 2013). V rozporu s uvedenými příklady studií na myších modelech, kde IL-17 ovlivnil diferenciacní potenciál MSC, studie S. Mojsilovic a kolegů neprokázala vliv IL-17 na diferenciaci myších BM-MS (Mojsilović et al., 2011). Kvůli zásadním rozdílům ve výsledcích různých vědeckých skupin se dá posoudit, že fenotypický profil, funkcionální heterogenita, diferenciacní potenciál, a odpověď na zánětlivé podmínky MSC, se v závislosti na původu buněk (druh, dárci, tkáň) velmi liší.

IL-17 se často používá jako alternativa k INF- γ primingu, protože tímto způsobem primované lidské MSC vykazují velmi podobné imunopresivní účinky, a zároveň jsou hypoimmunogenní díky tomu, že produkují nižší hladiny MHCI a II než po INF- γ primingu (Sivanathan et al., 2017). Navíc, IL-17 umožňuje modulaci diferenciaci MSC do buněk specifických typů tkání, což opět zesiluje kontrolu nad výsledky a usnadňuje jejich predikci.

2.4. Kombinace cytokinů

V současnosti se stává čím dál tím populárnější strategií primingu kombinace několika cytokinů, což zvyšuje efektivitu primingu, a snižuje variabilitu výsledků mezi různými dárci.

Nejčastější kombinací je IFN- γ a TNF- α , jejichž účinky byly popsány v předchozí kapitole (kapitola „Priming pomocí tumor nekrotického faktoru α (TNF- α)“). Často se ale přidávají i další cytokiny a farmakologické látky, a to například IL-1 β či lipopolysacharidy (LPS), curcumin a další (Noronha et al., 2019).

Kombinace IFN- γ , TNF- α a IL-1 β je velmi efektivní, protože kombinuje, a zároveň posiluje, efekty každého z jednotlivých cytokinů díky aktivaci většího množství signálních drah. IFN- γ primárně aktivuje STAT1 a dráhu JAK-STAT (Darnell et al., 1994), čímž zvyšuje hladinu CXCL10 (také známý jako interferon gamma-induced protein 10) a IDO1 (Meisel et al., 2004; Peperzak et al., 2013). TNF- α a IL-1 β zase spouštějí signalizaci NF- κ B a MAPK, čímž zesilují produkci IL-6, COX2 a CCL2 (Hess et al., 2009; Wang et al., 2006). Zvýšením hladiny imunosupresivních faktorů, jako jsou IDO1, COX2, PD-L1, a PD-L2 buňky inhibují aktivaci CTL a podporují tvorbu Treg. (Augello et al., 2005; Meisel et al., 2004), což vede k potlačení imunitní odpovědi. Navíc, po krátkodobém primingu těmito cytokiny, byl prokázán vliv jejich kombinace na dárcem podmíněnou heterogenitu genové exprese a syntézy proteinů v MSC (Valencia et al., 2025).

Při studiu vlivu kombinace různých cytokinů na diferenciaci MSC dochází ke rozličným pozorováním a výsledkům. Studie K.M. Fawzy El-Sayed a kolegů ukázala, že po primingu TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (100 ng/ml), a IL-1 β (1 ng/ml) se hladina raných osteogenních markerů (RUNX2, ALPL) signifikantně snižuje, kdežto hladina pozdějších osteogenních markerů (COL1A1, OCN) zůstává beze změny (Fawzy El-Sayed et al., 2020). Někteří autoři naopak prokázali, že IL-1 β a TNF- α potlačují osteogenní (Lacey et al., 2009; Rogulska et al., 2025) a adipogenní diferenciaci (Sullivan et al., 2014) BM-*MSC*. Dále několik studií, včetně studie M. Duijvesteina et al. a J. Valencia et al., uvádí, že diferenciací potenciál BM-*MSC* směrem k osteoblastům, adipocytům a chondroblastům zůstává po primingu těmito cytokiny neměnným (Duijvestein et al., 2011; Valencia et al., 2025).

3. Priming 3D kultivací ve sféroidech

Historicky byly MSC po izolaci z tkání udržovány zpravidla ve formě adherentní monovrstvy v kultivační lahvi. Později však bylo pozorováno, že kolonií buněk mají tendenci tvořit pelety (Johnstone et al., 1998), a že centrifugace buněk způsobuje formování malých shluků a větších agregátů, což výrazně ovlivňuje jejich výsledné charakteristiky (Arufe et al., 2009; Bartosh et al., 2010).

V dnešní době je však populární, z technického hlediska relativně jednoduchá alternativa, která zároveň zesiluje terapeutické účinky MSC, a to – kultivace ve formě sféroidů. Počátky metody kultivace buněk ve 3D sférách můžeme sledovat již v první polovině XX. století, kdy byla úspěšně využívána pro kultivaci embryonálních a nádorových buněk, pro účely zkoumání morfologie/organogeneze, malignity, a efektů různých terapeutik proti nádorům (Mueller-Klieser, 1997).

Vyskytuje se několik metod přípravy 3D kultur z živých buněk. V případě MSC jsou nejčastěji využívané následující metody:

- 1) Metoda visící kapky (tzv. hanging drop metoda) – je tradiční technika, při které je malá kapka buněčné kultury, obvykle o objemu 10-30 μl , zavěšena ze středu krycího sklíčka/víčka do Petriho misky naplněné roztokem (např. PBS) (Foty, 2011). Buňky formují sféru na spodní části kapky působením gravitačních sil.
- 2) Metoda kapalného překryvu (tzv. liquid overlay metoda) je technika kultivace na neadhezivních površích, využívající destičky s jamkami. Dna těchto jamek jsou ve tvaru U a jejich povrch je potažen málo adhezivní látkou, jako je například agaróza. Podobně jako v předchozí metodě, buňky se vlivem gravitace postupně shlukují, a následně formují sféroidy (Costa et al., 2018; Yuhás et al., 1977).
- 3) Metoda rotující se lahve (tzv. spinner flask metoda) spočívá v neustálé rotaci a míchání média s buňkami, což zabraňuje adhezi, a zvyšuje pravděpodobnost interakcí mezi nimi. Tato technika je vhodná pro velkoobjemovou produkci, ale vyžaduje pečlivou kontrolu odstředivých sil, aby nedošlo k poškození buněk (Yang et al., 2022).
- 4) Metoda agitace/otřesu (tzv. shaking culture) používá podobnou neadhezivní úpravu povrchů kultivačních nádob jako liquid overlay, tyto nádoby jsou však vystaveny kontinuálnímu otřesu třepačkou. Otřes podporuje tvorbu sféroidů a zachovává jejich 3D strukturu (Niibe et al., 2020).
- 5) Další metody pro kultivaci sféroidů jsou založeny na využití scaffoldů. K jejich výrobě jsou využívány biomateriály, jako jsou např. hydrogely nebo chitosanové membrány pro agregaci buněk. Tyto materiály pomáhají tvorbě sféroidů tím, že poskytují strukturní podporu (Laschke et al., 2013; Miyagawa et al., 2011). Materiál, ze kterého je scaffold vytvořen, může také významně ovlivňovat charakteristiky MSC (Petrenko et al., 2017), což by mělo být vzato v potaz při plánování pokusu a následném hodnocení výsledků.

Hlavními výhodami trojdimenzionální kultivace před dvoudimenzionální je zvětšení plochy přímého kontaktu mezi buňkami, a bližší podobnost kultivačních podmínek s přirozeným mikroprostředím tkání *in vivo*. Krátkodobá kultivace buněk ve 3D kultuře nezpůsobuje výrazné změny v expresi povrchových markerů, mnoho vědeckých skupin však poukázalo na podstatné změny ve schopnosti adheze MSC buněk (Potapova et al., 2008; Ryang et al., 2009), v jejich protizánětlivých a angiogenních účincích (Bartosh et al., 2010; Bhang et al., 2012;

Potapova et al., 2007), kmenovosti (Guo et al., 2014), a také jejich viabilitě po aplikaci do organismu recipienta (Bhang et al., 2012; Lee et al., 2009; Zhang et al., 2012) (Obr.1).

V dnešní době je známo, že ve srovnání s buňkami kultivovanými v monovrstvě, lidské MSC, krátkodobě kultivované ve formě sféroidů mají zvýšenou expresi genu *CXCR4* (Potapova et al., 2008), který podporuje jejich schopnost adheze na endoteliální buňky, a zároveň vykazují sníženou hladinu transmembránového proteinu PODXL (Ryang et al., 2009), který má antiadhezivní vlastnosti díky svému silně negativnímu náboji. Ve výsledku mají buňky lepší adhezivní schopnosti, což podporuje jejich migrační schopnost (homing).

I. Potapova a kolegové provedli výzkum, ve kterém srovnali obsah média odebraného z MSC kultivovaných v monovrstvě s těmi, co byly kultivovány ve sférách. Pomocí kvantitativní analýzy bylo zjištěno, že koncentrace angiogeninu (ANG), fibroblastického růstového faktoru 2 (FGF-2), Angiopoetinu 2 (ANGPT-2), VEGF, procathepsinu B, IL-11, a kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP2) byly 5-20krát vyšší v sféroidní kultuře, než v adhezivní (Potapova et al., 2007). Výsledky potvrdily hypotézu, že MSC jsou trofickými mediátory pro endoteliální buňky, a prokázaly, že buňky kultivované ve sféroidech jsou v tomto směru efektivnější.

Několik následně zjištěných rozdílů mezi buňkami kultivovanými ve dvou- a trojdimenzionálních kulturách měly velký význam pro potenciál terapeutického využití lidských MSC primovaných kultivací ve sféroidech. Ve studii T. Bartosh a kolegů (Bartosh et al., 2010) se prokázalo, že hladina protizánětlivého proteinu kódovaného genem 6 indukovatelného nádorovým nekrotickým faktorem (TSG-6) byla vyšší, než byla dříve pozorována při kultivaci MSC stimulovaných TNF- α (Lee et al., 2009). Rovněž byla detekována zvýšená exprese genu pro stanniocalcin-1 (STC-1) (Bartosh et al., 2010), proteinu s protizánětlivými a antiapoptotickými vlastnostmi (Block et al., 2009; Huang et al., 2009). Hladiny obou proteinů (TSG-6 a STC-1) zůstávaly zvýšené po dobu nejméně 24 hodin po disociaci buněk ze sféroidních struktur. Tyto výsledky ukazují, že ve srovnání s MSC kultivovanými v adherentních podmínkách, mohou jak sféroidy, tak z nich odvozené MSC vykazovat vyšší účinnost v modulaci zánětlivých odpovědí. Tato hypotéza byla dále podpořena experimentálním zjištěním, že sféroidy, a z nich odvozené MSC efektivněji inhibovaly produkci TNF- α aktivovanými makrofágy v *in vitro* podmínkách (Bartosh et al., 2010).

Narozdíl od výše zmíněných proteinů, měření hladiny jednoho z klíčových imunopresorů,IDO, však neukázalo žádné podstatné změny ve srovnání se 2D kulturami (Zimmermann & Mcdevitt, 2014).

I. S. Park a kolegové provedli lokální injekci AT-MSK do svalů myši, trpících na ischemii a částečnou nekrózu tkání končetin. MSC kultivované ve formě 3D kultury byly předběžně pozorovány *in vitro*, což vedlo ke zjištění, že během tří dnů začínají buňky vylučovat angiogenní faktory (VEGF, IL-8), a přeměňovat se na cévní buňky. Následně byly MSC uvedeny do dvou skupin myši, přičemž první skupina dostala klasicky kultivované AT-MSK, a druhé skupině uvedli do organismu 3D kultivované buňky. V první skupině bylo pozorováno zpomalení nekrotických procesů, avšak u 50 % myši došlo ke ztrátě končetin během následujících 28 dní. V druhé skupině rovněž bylo detekováno zpomalení nekrotických procesů, a následně navíc došlo k částečné regeneraci vaskularizace, což zabránilo ztrátě končetin u 89 % jedinců (Park et al., 2014). Jedná se o první studii, která demonstrovala přímou vaskularizaci pomocí MSC kultivovaných ve sféroidech v ischemickém zvířecím modelu, a

otevřela tím nové teoretické možnosti využití těchto buněk v léčbě nemocí kardiovaskulárního systému.

Zvláštní pozornost si zaslouží výzkum J. Frithe a kolegů, kteří kultivovali MSC pomocí spinning flask metody a rotačního bioreaktoru, a prokázali, že v buňkách sféroidů byly produkovány vysoké hladiny tumor supresorového proteinu IL-24 (Frith et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že sféroidy MSC, připravené za optimalizovaných podmínek pro produkci TSG-6, vykazovaly rovněž vysoké hladiny transkriptů pro TRAIL protein, selektivně indukující apoptózu u některých nádorových buněk (Bartosh et al., 2010; Mellier et al., 2010), a pro CD82, který potlačuje metastatické šíření některých typů rakovinných buněk (Bartosh et al., 2010). Tyto výsledky naznačují, že sféroidy a z nich odvozené MSC mohou být zvláště účinné jako adjuvantní terapie pro některé typy nádorových onemocnění, zejména pro léčbu nádorů citlivých na protizánětlivé látky.

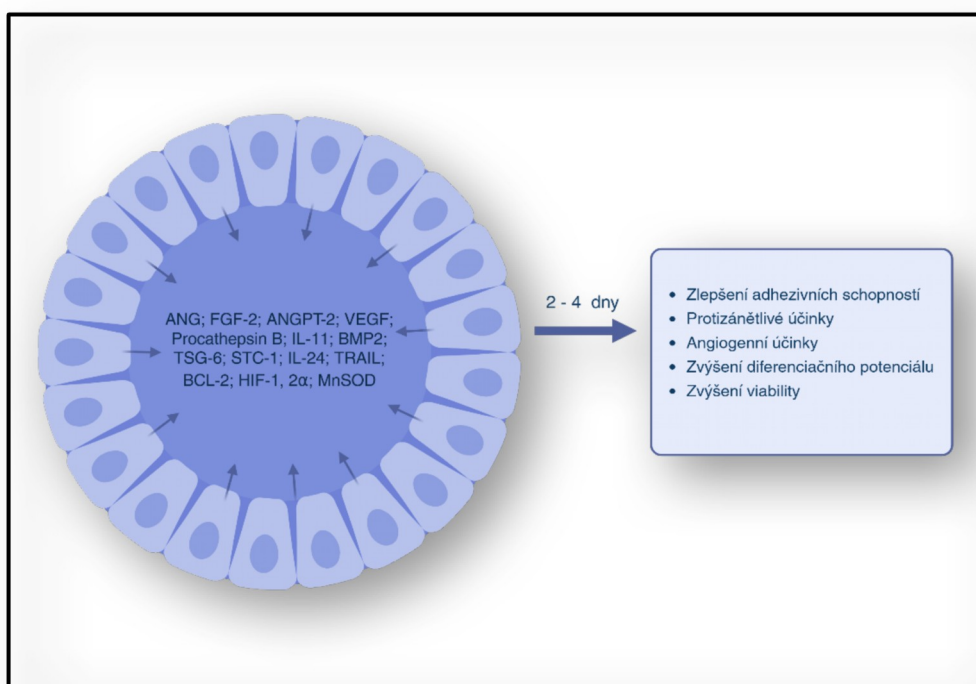
R. Lee a kolegové uvádí, že další výhodou 3D primingu je velikost MSC, která je při tomto způsobu kultivace buněk čtyřikrát menší než v adherentních kulturách. Z tohoto zjištění lze usoudit, že po intravenózní injekci existuje nižší pravděpodobnost zachycení (zastavení) velkého počtu těchto malých buněk v plicích. Tento důsledek 3D primingu tedy znamená, že buňky v hojnějším počtu dorazí do cílových tkání (Lee et al., 2009; Ryang et al., 2009). Vyskytují však další faktory, které mají vliv na přežití buněk, jelikož MSC kultivované ve sférách mají mnohem nižší míru apoptózy ve srovnání s klasicky kultivovanými MSC (v 2D kultuře). Prvním z nich je zvýšená produkce hypoxia-inducibilního faktoru (HIF)-1/2 α a manganázy superoxid dismutázy (MnSOD), které snižují riziko spuštění apoptózy způsobené oxidativním stresem (Zhang et al., 2012). Druhým faktorem je nárůst hladiny antiapoptotického proteinu BCL-2 a pokles hladiny proapoptotického Bax (Bhang et al., 2012).

Dalším důležitým následkem 3D kultivace jsou změny v multipotenci, neboli tzv. „kmenovosti“ MSC. Buňky dlouhodobě pěstované v monovrstvě vykazují známky stárnutí a spontánní diferenciaci (zvětšení velikostí buněk a exprese osteogenních a adipogenních genů), horší schopnost tzv. buněčného traffickingu a homingu, snížení produkce parakrinních faktorů a pokles efektivity obnovy tkání. (Krampera et al., 2005; Li et al., 2011; Wu & Zhao, 2012)*. Takové změny mohou být kritické z hlediska terapeutického využití a klinické relevance MSC.

L. Guo a kolegové ve své studii ukázali, že krátkodobá (dva až tři dny) kultivace MSC ve sféroidech může u buněk způsobit navrácení jejich multipotence a změnu jejich epigenetického profilu (Guo et al., 2014). Nárůst množství MSC klonů byl pozorován ihned po disociaci buněk ze sféroidů. Autoři uvádí, že naměřili zvýšenou hladinu exprese genů pluripotence – *Oct4*, *Sox2* a *Nanog*, stejně jako genu kódujícího protein telomerasová reverzní transkriptáza (TERT), který umožňuje průběh většího množství buněčných cyklů, aniž by docházelo k senescenci buněk. Bylo také pozorováno, že změny genové exprese jsou podmíněny hlavně epigenetickými faktory, jmenovitě miRNA a acetylací histonu H3K9. Řada studií uvádí, že miRNA hrají podstatnou roli v multipotenci a diferenciacích schopnostech buněk (Guo et al., 2011; Xu et al., 2009). V případě studie L. Guo bylo prokázáno navýšení množství miRNA (miR-489, miR-370 a miR-433), zodpovědných právě za multipotenci a převedení dospělých MSC do klidového stavu (tzv. quiescence), a naopak snížené množství miRNA, přispívajících k buněčné diferenciaci (miR-7, miR-21 a miR-24) (Guo et al., 2011). Dále také buňky vykazovaly zvýšený neurální diferenciací potenciál, a to za zachování schopností osteogeneze

a adipogeneze (Guo et al., 2014), což může výrazně rozšířit potenciál MSC pro využití v terapii neurologických onemocnění.

V roce 2010 se také ukázalo, že sféroidy AT-MSC lze použít pro léčbu dermálních ran. Amos a kolegové provedli studii na diabetickém myším modelu charakterizovaným deficitem leptinového receptoru. Knock-out genu pro leptinový receptor způsobuje dysfunkci řady enzymatických kaskád, vedoucí k vytvoření a následnému setrvání diabetických dermálních ran. Ve srovnání se skupinami, kterým bylo uvedeno do organismu specifický počet MSC předběžně disociovaných ze sféroidů, byla u skupin, kde byly buňky ve stejném počtu uvedeny do organismu ve formě sféroidů, pozorována významně vyšší rychlost hojení ran. Autoři prokázali, že sféroidy MSC produkovaly výrazně větší množství proteinů ECM, včetně tenascin C, kolagenu VI alfa 3 a fibronektinu (Amos et al., 2010), což přispělo k rychlejšímu zahojení dermálních ran.



Obrázek 1. Vliv krátkodobé kultivace ve sféroidech na mesenchymální stromální buňky. Zkratky: *ANG* angiogenin, *FGF* fibroblastický růstový faktor, *ANGPT-2* angiopoietin-2, *VEGF* vaskulární endoteliální růstový faktor, *IL* interleukin, *BMP2* kostní morfogenetický protein-2, *TSG-6* protein genu 6 indosovatelný nádorovým nekrotickým faktorem, *STC-1* stanniocalcin-1, *TRAIL* ligand indukující apoptózu příbuzný faktorů nádorové nekrózy, *BCL-2* B-cell lymfom 2, *HIF* růstový faktor hepatocytů, *MnSOD* manganáza superoxid dismutáza. Created with BioRender.com.

3D priming MSC představuje inovativní přístup ke zlepšení jejich terapeutických vlastností. Kultivace MSC ve sféroidech nejen napodobuje přirozené mikroprostředí tkání, ale i významně ovlivňuje jejich charakteristiky, včetně produkce různých parakrinních faktorů, adhezivních schopností, a v neposlední řadě také viability po aplikaci do organismu. Bylo prokázáno, že 3D priming zvyšuje expresi protizánětlivých a angiogenních faktorů, zlepšuje odolnost buněk vůči stresovým podmínkám, a může dokonce vést k obnovení jejich multipotence. Výše zmíněné změny mohou hrát klíčovou roli v klinickém využití MSC pro regenerativní medicínu, léčbu zánětlivých onemocnění, a dokonce i onkoterapii. Přestože 3D kultivace přináší řadu výhod, je

zapotřebí dalšího výzkumu k optimalizaci podmínek kultivace, a porozumění molekulárním mechanismům, které vedou ke zlepšení terapeutických vlastností MSC.

4. Porovnání primingu MSC cytokiny a 3D kultivací

Pro porovnání dvou metod primingu je potřeba uvést shrnutí klíčových informací spojených s každou z nich.

4.1. Priming cytokiny shrnutí

Priming cytokiny se zakládá na vystavení MSC protizánětlivým molekulám. Hlavním cílem je aktivace určité imunomodulační dráhy v MSC napodobením zánětlivého mikroprostředí. Stimulace vyvolává hluboké transkriptomické změny, které vedou ke zvýšené expresi imunomodulačních molekul, což se promítá do zesílených parakrinních signálů a jejich účinků, a imunomodulace, zprostředkované přímým buněčným kontaktem (Hu & Li, 2018; Noronha et al., 2019)*. Takovým způsobem jsou MSC schopné ovlivňovat řadu buněk adaptivní (různé typy T-lymfocytů, někdy se uvádí i B-lymfocyty) a vrozené (DC, NK buňky, Makrofágy) imunity (viz kapitola „Priming cytokiny“). Účinky různých přidávaných cytokinů, stejně jako jejich dávkování, mohou na imunitní systém působit odlišně, což rozšiřuje potenciál využití této metody. Ať už dochází k podpoře imunitní odpovědi, nebo k jejímu potlačení, oba výsledky představují formu imunomodulačního terapeutického efektu.

Mimo přímého ovlivnění imunitního systému má priming cytokiny další významnou výhodu, a to snížení heterogenity mezi jednotlivými dárci (Szabó et al., 2015; Valencia et al., 2025). Konzistentnější imunomodulační aktivita vede ke sjednocení výsledků, a je klíčová pro zlepšení reprodukovatelnosti a přesnější predikci výsledků v klinických aplikacích.

Terapeutické účinky MSC po primingu cytokiny přetrvávají v čase, a zůstávají aktivní i po sekundárních zánětlivých stimulech (Chinnadurai et al., 2016; Herger et al., 2024). Tato perzistence terapeutických účinků buněk naznačuje, že funkční změny vyvolané cytokinovým primingem nejsou pouze přechodné, ale představují stabilní fenotypový posun, který může poskytnout dlouhodobé terapeutické přínosy při léčbě zánětlivých onemocnění charakterizovaných opakujícími se vzplanutími.

Kromě výše uvedeného, priming cytokiny většinou nezpůsobuje velké změny diferenciačního potenciálu, imunofenotypu, ani viability MSC, čímž zachovává jejich základní vlastnosti a zároveň posiluje jejich terapeutické funkce.

Výše zmíněné efekty činí priming cytokiny vhodným pro léčbu onemocnění spojených s imunitním systémem (autoimunní onemocnění, GvHD aj.), nebo v případě opakujících se vzplanutí. Kromě toho, MSC stimulované cytokiny mohou také podporovat imunitní systém v případě jeho oslabení.

4.2. Priming 3D kultivací shrnutí

Priming MSC pomocí 3D kultivace ve sféroidech, má za cíl vytvoření mikroprostředí napodobujícího přirozené *in vivo* podmínky a tímto způsobem snížit stres, kterému budou MSC vystaveny po uvedení do organismu recipienta (Hu & Li, 2018; Noronha et al., 2019)*. Na rozdíl od tradičních 2D kultur, trojrozměrné prostředí umožňuje přirozenější buněčné interakce a produkci extracelulární matrix. Takové uspořádání posiluje buněčné komunikační síť, čímž zlepšuje terapeutické výsledky jak mechanickými, tak biochemickými mechanismy.

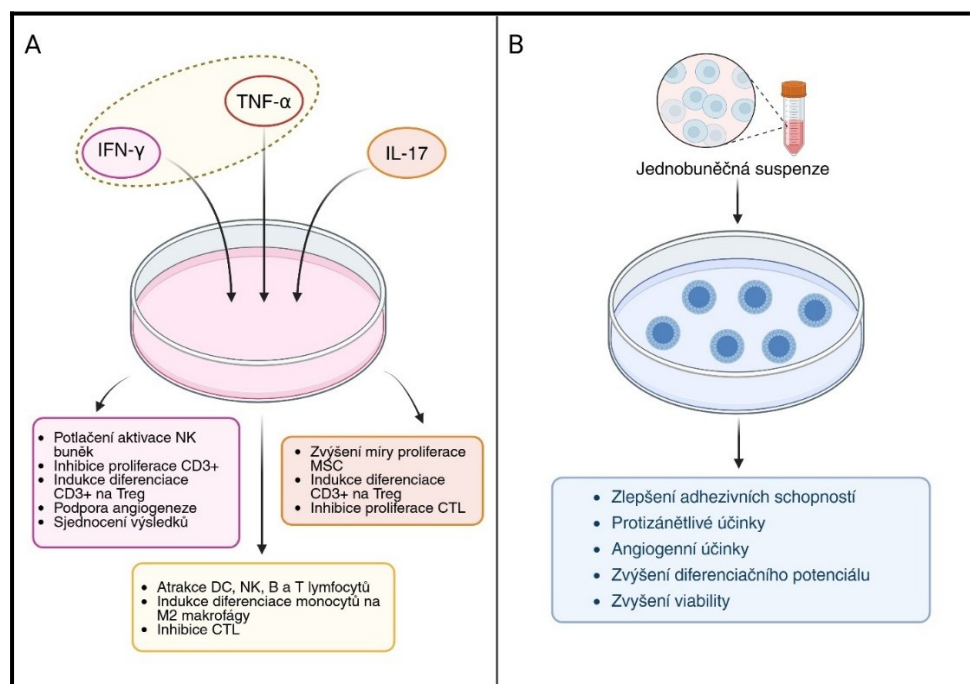
3D priming také posiluje imunomodulační vlastnosti MSC, avšak prostřednictvím odlišných mechanismů, než cytokinová stimulace (Bartosh et al., 2010). 3D prostředí vytváří podmínky podporující neustálou mezibuněčnou komunikaci, což vede k udržení regulačních funkce. Imunomodulace však není tak výrazná jako v případě cytokinů a není hlavní výhodou metody.

Jak již bylo zmíněno dříve, 3D kultivace způsobuje zlepšení adhezivních (Potapova et al., 2008; Ryang et al., 2009), angiogenních (Bhang et al., 2012; Potapova et al., 2007) a regeneračních (Amos et al., 2010) schopností buněk, obnovuje jejich potenci (Guo et al., 2014), a výrazně zvyšuje viabilitu (Bhang et al., 2012; Lee et al., 2009; Zhang et al., 2012). Takové spektrum účinků rozšiřuje potenciál jejich využití v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny nad rámec samotné imunomodulace. Řada studií také uvádí efektivitu MSC pěstovaných ve sféroidech v léčbě nádorových onemocnění (Frith et al., 2009).

Přesto, že existuje několik výhod 3D primingu, setrvání jeho účinků se zdá být více závislé na zachování fyzického trojrozměrného prostředí, než na konkrétních molekulárních změnách (Herger et al., 2024). To naznačuje, že samotná 3D struktura poskytuje trvalé stimuly, které udržují vylepšený funkční stav MSC.

Shrnutím výše předloženého lze dojít k závěru, že 3D priming MSC má využití hlavně v regenerativní medicíně, tkáňovém inženýrství, a vykazuje perspektivu pro protinádorovou terapii. Imunosupresivní účinky a zlepšení přežití a homingu buněk činí 3D kultivaci MSC také vhodnou metodou primingu pro buněčnou léčbu GvHD.

4.3. Komplementární účinky primingu



Obrázek 2. A – Výhody primingu cytokiny, B – výhody primingu 3D kultivace ve sféroidech. Zkratky: *IFN- γ* interferon γ , *TNF- α* faktor nádorové nekrózy α , *IL-17* interleukin-17, *NK* natural killer, *CD3+* prekurzory cytotoxických T-lymfocytů, *Treg* T regulatorní lymfocyty, *DC* dendritické buňky, *CTL* cytotoxické T-lymfocyty. Created with BioRender.com.

Rozdílné mechanismy zapojené do cytokinového a 3D primingu (Obr. 2) naznačují jejich potenciální komplementární účinky. Zatímco priming cytokiny vyniká ve zlepšování imunomodulačních funkcí a snižování variability mezi dárci, 3D priming poskytuje lepší

viabilitu, homing, a zachování diferenciačního potenciálu buněk. Tato komplementarita otevírá možnost kombinovaných přístupů, které by mohly přinést synergické výhody pro specifické terapeutické aplikace.

5. Závěr

Výběr mezi dvěma přístupy primingu (cytokiny, 3D kultivace) by měl být řízen specifickými terapeutickými cíli, konkrétním onemocněním, a praktickými aspekty klinické implementace. Budoucí výzkum by měl prozkoumat možnosti kombinovaných přístupů, které by mohly maximalizovat terapeutický potenciál MSC v širokém spektru klinických aplikací.

6. Literatura

- 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*(9), 994–1010. <https://doi.org/10.1002/embj.201386030>
- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., & Shi, S. (2012). Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, *10*(5), 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.007>
- Amos, P. J., Kapur, S. K., Stapor, P. C., Shang, H., Bekiranov, S., Khurgel, M., Rodeheaver, G. T., Peirce, S. M., & Katz, A. J. (2010). Human Adipose-Derived Stromal Cells Accelerate Diabetic Wound Healing: Impact of Cell Formulation and Delivery. *Tissue Engineering Part A*, *16*(5), 1595–1606. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0616>
- Ankrum, J. A., Ong, J. F., & Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, *32*(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/nbt.2816>
- Antunes, M. A., Abreu, S. C., Cruz, F. F., Teixeira, A. C., Lopes-Pacheco, M., Bandeira, E., Olsen, P. C., Diaz, B. L., Takyia, C. M., Freitas, I. P., Rocha, N. N., Capelozzi, V. L., Xisto, D. G., Weiss, D. J., Morales, M. M., & Rocco, P. R. (2014). Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema. *Respiratory Research*, *15*(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12931-014-0118-x>
- Arufe, M. C., De La Fuente, M. C., Fuentes-Boquete, I., De Toro, F. J., & Blanco, F. J. (2009). Differentiation of synovial CD-105+ human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, *108*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1002/jcb.22238>
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., & Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*, *35*(5), 1482–1490. <https://doi.org/10.1002/eji.200425405>
- Baratelli, F., Lin, Y., Zhu, L., Yang, S.-C., Heuzé-Vourc'h, N., Zeng, G., Reckamp, K., Dohadwala, M., Sharma, S., & Dubinett, S. M. (2005). Prostaglandin E2 Induces *FOXP3* Gene Expression and T Regulatory Cell Function in Human CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology*, *175*(3), 1483–1490. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1483>
- Barbash, I. M., Chouraqui, P., Baron, J., Feinberg, M. S., Etzion, S., Tessone, A., Miller, L., Guetta, E., Zipori, D., Kedes, L. H., Kloner, R. A., & Leor, J. (2003). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, *108*(7), 863–868. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000084828.50310.6A>
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, *30*(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X)
- Bartosh, T. J., Ylöstalo, J. H., Mohammadipour, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R. H., Choi, H., & Prockop, D. J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(31), 13724–13729. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008117107>

- Behm, C., Mišek, O., Rausch-Fan, X., Moritz, A., & Andrukhov, O. (2024). Paracrine- and cell-contact-mediated immunomodulatory effects of human periodontal ligament-derived mesenchymal stromal cells on CD4⁺ T lymphocytes. *Stem Cell Research & Therapy*, *15*(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03759-4>
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., & Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, *105*(5), 2214–2219. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2921>
- Bhang, S. H., Lee, S., Shin, J. Y., Lee, T. J., & Kim, B. S. (2012). Transplantation of cord blood mesenchymal stem cells as spheroids enhances vascularization. *Tissue Engineering - Part A*, *18*(19–20), 2138–2147. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0640>
- Block, G. J., Ohkouchi, S., Fung, F., Frenkel, J., Gregory, C., Pochampally, R., DiMattia, G., Sullivan, D. E., & Prockop, D. J. (2009). Multipotent Stromal Cells Are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1. *Stem Cells*, *27*(3), 670–681. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0742>
- Burnham, A. J., Foppiani, E. M., Goss, K. L., Jang-Milligan, F., Kamalakar, A., Bradley, H., Goudy, S. L., Trochez, C. M., Dominici, M., Daley-Bauer, L., Gibson, G., & Horwitz, E. M. (2023). Differential response of mesenchymal stromal cells (MSCs) to type 1 ex vivo cytokine priming: implications for MSC therapy. *Cytotherapy*, *25*(12), 1277–1284. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.08.014>
- Caplan, A. I. (1994). The mesengenic process. *Clinics in Plastic Surgery*, *21*(3), 429–435. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924141>
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine*, *6*(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Carlos Sepúlveda, J., Tomé, M., Eugenia Fernández, M., Delgado, M., Campisi, J., Bernad, A., & González, M. A. (2014). Cell Senescence Abrogates the Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells in the Lethal Endotoxemia Model. *Stem Cells*, *32*(7), 1865–1877. <https://doi.org/10.1002/stem.1654>
- Casiraghi, F., Azzollini, N., Cassis, P., Imberti, B., Morigi, M., Cugini, D., Cavinato, R. A., Todeschini, M., Solini, S., Sonzogni, A., Perico, N., Remuzzi, G., & Noris, M. (2008). Pretransplant Infusion of Mesenchymal Stem Cells Prolongs the Survival of a Semiallogeneic Heart Transplant through the Generation of Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, *181*(6), 3933–3946. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3933>
- Chabannes, D., Hill, M., Merieau, E., Rossignol, J., Brion, R., Soullou, J. P., Anegon, I., & Cuturi, M. C. (2007). A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*, *110*(10), 3691–3694. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-075481>
- Chan, J. L., Tang, K. C., Patel, A. P., Bonilla, L. M., Pierobon, N., Ponzio, N. M., & Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon. *Blood*, *107*(12), 4817–4824. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01>
- Chan, W. K., Lau, A. S.-Y., Li, J. C.-B., Law, H. K.-W., Lau, Y. L., & Chan, G. C.-F. (2008). MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN- γ challenge. *Experimental Hematology*, *36*(11), 1545–1555. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.06.008>
- Chang, J., Liu, F., Lee, M., Wu, B., Ting, K., Zara, J. N., Soo, C., Al Hezaimi, K., Zou, W., Chen, X., Mooney, D. J., & Wang, C. Y. (2013). NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem

- cells by promoting β -catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(23), 9469–9474. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300532110>
- Chang, S. H., & Dong, C. (2009). IL-17F: Regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine*, *46*(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.12.024>
- Chen, Z. ming, O'Shaughnessy, M. J., Gramaglia, I., Panoskaltis-Mortari, A., Murphy, W. J., Narula, S., Roncarolo, M. G., & Blazar, B. R. (2003). IL-10 and TGF- β induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood*, *101*(12), 5076–5083. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2798>
- Chinnadurai, R., Copland, I. B., Garcia, M. A., Petersen, C. T., Lewis, C. N., Waller, E. K., Kirk, A. D., & Galipeau, J. (2016). Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Are Susceptible to T-Cell Mediated Apoptosis Which Is Partly Rescued by IFN γ Licensing. *Stem Cells*, *34*(9), 2429–2442. <https://doi.org/10.1002/stem.2415>
- Costa, E. C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A. F., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2018). Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. *Biotechnology Journal*, *13*(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201700417>
- Crisostomo, P. R., Wang, Y., Markel, T. A., Wang, M., Lahm, T., & Meldrum, D. R. (2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *American journal of physiology. Cell physiology*, *294*(3), C675–C682. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00437.2007>
- Darnell, J. E., Kerr, Ian M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*, *264*(5164), 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>
- Devine, S. M., Bartholomew, A. M., Mahmud, N., Nelson, M., Patil, S., Hardy, W., Sturgeon, C., Hewett, T., Chung, T., Stock, W., Sher, D., Weissman, S., Ferrer, K., Mosca, J., Deans, R., Moseley, A., & Hoffman, R. (2001). Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Experimental Hematology*, *29*(2), 244–255. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(00\)00635-4](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00635-4)
- 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*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Duijvestein, M., Wildenberg, M. E., Welling, M. M., Hennink, S., Molendijk, I., Van Zuylen, V. L., Bosse, T., Vos, A. C. W., De Jonge-Muller, E. S. M., Roelofs, H., Van Der Weerd, L., Verspaget, H. W., Fibbe, W. E., Te Velde, A. A., Van Den Brink, G. R., & Hommes, D. W. (2011). Pretreatment with interferon- γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*, *29*(10), 1549–1558. <https://doi.org/10.1002/stem.698>
- Dunn, C. M., Kameishi, S., Cho, Y.-K., Song, S. U., Grainger, D. W., & Okano, T. (2022). Interferon-Gamma Primed Human Clonal Mesenchymal Stromal Cell Sheets Exhibit Enhanced Immunosuppressive Function. *Cells*, *11*(23), 3738. <https://doi.org/10.3390/cells11233738>
- English, K., Barry, F. P., Field-Corbett, C. P., & Mahon, B. P. (2007). IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters*, *110*(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.04.001>
- English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., Barry, F. P., & Mahon, B. P. (2009). Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human

- mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25^{High}forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 156(1), 149–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03874.x>
- Faezi, M., Nasser Maleki, S., Aboutaleb, N., & Nikougoftar, M. (2018). The membrane mesenchymal stem cell derived conditioned medium exerts neuroprotection against focal cerebral ischemia by targeting apoptosis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 94, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2018.08.004>
- Fawzy El-Sayed, K. M., Nguyen, N., & Dörfer, C. E. (2020). Ascorbic Acid, Inflammatory Cytokines (IL-1 β /TNF- α /IFN- γ), or Their Combination's Effect on Stemness, Proliferation, and Differentiation of Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells International*, 2020, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2020/8897138>
- Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of Visualized Experiments*, 51. <https://doi.org/10.3791/2720>
- François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., & Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular Therapy*, 20(1), 187–195. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.189>
- Franquesa, M., Mensah, F. K., Huizinga, R., Strini, T., Boon, L., Lombardo, E., Delarosa, O., Laman, J. D., Grinyó, J. M., Weimar, W., Betjes, M. G. H., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2015). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells*, 33(3), 880–891. <https://doi.org/10.1002/stem.1881>
- Friedenstein, A., & Kuralesova, A. I. (1971). Osteogenic Precursor Cells of Bone Marrow in Radiation Chimeras. *Transplantation*, 12, 99–108.
- Frith, J. E., Thomson, B., & Genever, P. G. (2010). Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(4), 735–749. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0432>
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A. C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., & Bromberg, J. S. (2004). TGF- β induces Foxp3⁺ T-regulatory cells from CD4⁺ + CD25⁻ precursors. *American Journal of Transplantation*, 4(10), 1614–1627. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x>
- Gil-Chinchilla, J. I., Bueno, C., Martínez, C. M., Ferrández-Múrtula, A., García-Hernández, A. M., Blanquer, M., Molina-Molina, M., Zapata, A. G., Sackstein, R., Moraleda, J. M., & García-Bernal, D. (2024). Optimizing cryopreservation conditions for use of fucosylated human mesenchymal stromal cells in anti-inflammatory/immunomodulatory therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1385691>
- Guo, L., Zhao, R. C. H., & Wu, Y. (2011). The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 39(6), 608–616. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2011.01.011>
- Guo, L., Zhou, Y., Wang, S., & Wu, Y. (2014). Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(10), 2009–2019. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12336>
- Herger, N., Heggli, I., Mengis, T., Devan, J., Arpesella, L., Brunner, F., Distler, O., & Dudli, S. (2024). Impacts of priming on distinct immunosuppressive mechanisms of mesenchymal stromal cells under translationally relevant conditions. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03677-5>

- Hess, K., Ushmorov, A., Fiedler, J., Brenner, R. E., & Wirth, T. (2009). TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- κ B signaling pathway. *Bone*, 45(2), 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.04.252>
- Horwitz, E. M., & Keating, A. (2000). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: What are they? *Cytotherapy*, 2(5), 387–388. <https://doi.org/10.1080/146532400539305>
- Hu, C., & Li, L. (2018). Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(3), 1428–1442. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13492>
- Hu, C.-H., Tseng, Y.-W., Chiou, C.-Y., Lan, K.-C., Chou, C.-H., Tai, C.-S., Huang, H.-D., Hu, C.-W., Liao, K.-H., Chuang, S.-S., Yang, J.-Y., & Lee, O. K. (2019). Bone marrow concentrate-induced mesenchymal stem cell conditioned medium facilitates wound healing and prevents hypertrophic scar formation in a rabbit ear model. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 275. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1383-x>
- Huang, H., He, J., Teng, X., Yu, Y., Ye, W., Hu, Y., & Shen, Z. (2013). Combined intrathymic and intravenous injection of mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft associated with decrease in miR-155 expression. *Journal of Surgical Research*, 185(2), 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.06.015>
- Huang, H., Kim, H. J., Chang, E.-J., Lee, Z. H., Hwang, S. J., Kim, H.-M., Lee, Y., & Kim, H.-H. (2009). IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death & Differentiation*, 16(10), 1332–1343. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.74>
- Huang, L., Garcia, G., Lou, Y., Zhou, Q., Truong, L. D., DiMattia, G., Lan, X. R., Lan, H. Y., Wang, Y., & Sheikh-Hamad, D. (2009). Anti-inflammatory and renal protective actions of stanniocalcin-1 in a model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *The American Journal of Pathology*, 174(4), 1368–1378. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080476>
- Hwang, B., Liles, W. C., Waworuntu, R., & Mulligan, M. S. (2016). Pretreatment with bone marrow-derived mesenchymal stromal cell-conditioned media confers pulmonary ischemic tolerance. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 151(3), 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.11.043>
- Inoue, S., Popp, F. C., Koehl, G. E., Pisco, P., Schlitt, H. J., Geissler, E. K., & Dahlke, M. H. (2006). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation*, 81(11), 1589–1595. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000209919.90630.7b>
- Iso, Y., Spees, J. L., Serrano, C., Bakondi, B., Pochampally, R., Song, Y.-H., Sobel, B. E., Delafontaine, P., & Prockop, D. J. (2007). Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(3), 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.045>
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., & Yoo, J. U. (1998). In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Experimental Cell Research*, 238(1), 265–272. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858>
- Kimura, A., Naka, T., & Kishimoto, T. (2007). IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12099–12104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705268104>
- Kondo, M., Yamaoka, K., Sonomoto, K., Fukuyo, S., Oshita, K., Okada, Y., & Tanaka, Y. (2013). IL-17 Inhibits Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(11), e79463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079463>

- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlaschi, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2006). Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, *24*(2), 386–398. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>
- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., & Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, *101*(9), 3722–3729. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2104>
- Krampera, M., Pasini, A., Rigo, A., Scupoli, M. T., Tecchio, C., Malpeli, G., Scarpa, A., Dazzi, F., Pizzolo, G., & Vinante, F. (2005). HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*, *106*(1), 59–66. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3645>
- Kwon, H. M., Hur, S. M., Park, K. Y., Kim, C. K., Kim, Y. M., Kim, H. S., Shin, H. C., Won, M. H., Ha, K. S., Kwon, Y. G., Lee, D. H., & Kim, Y. M. (2014). Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, *63*(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.06.004>
- Lacey, D. C., Simmons, P. J., Graves, S. E., & Hamilton, J. A. (2009). Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis and Cartilage*, *17*(6), 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.11.011>
- Laschke, M. W., Schank, T. E., Scheuer, C., Kleer, S., Schuler, S., Metzger, W., Eglin, D., Alini, M., & Menger, M. D. (2013). Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomaterialia*, *9*(6), 6876–6884. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.013>
- Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S., & Caplan, A. I. (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplantation*, *16*(4), 557–564. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8528172>
- Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., & Prockop, D. J. (2009). Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, *5*(1), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>
- Lee, R. H., Seo, M. J., Pulin, A. A., Gregory, C. A., Ylostalo, J., & Prockop, D. J. (2009). The CD34-like protein PODXL and $\alpha 6$ -integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood*, *113*(4), 816–826. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-128702>
- Li, Z., Liu, C., Xie, Z., Song, P., Zhao, R. C. H., Guo, L., Liu, Z., & Wu, Y. (2011). Epigenetic Dysregulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Spontaneous Differentiation. *PLoS ONE*, *6*(6), e20526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020526>
- Ling, W., Zhang, J., Yuan, Z., Ren, G., Zhang, L., Chen, X., Rabson, A. B., Roberts, A. I., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). Mesenchymal Stem Cells Use IDO to Regulate Immunity in Tumor Microenvironment. *Cancer Research*, *74*(5), 1576–1587. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1656>
- Liu, B., Ding, F., Liu, Y., Xiong, G., Lin, T., He, D., Zhang, Y., Zhang, D., & Wei, G. (2018). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells conditioned medium attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells in an irreversible model of unilateral ureteral obstruction. *Nephrology*, *23*(8), 728–736. <https://doi.org/10.1111/nep.13099>

- Luz-Crawford, P., Djouad, F., Toupet, K., Bony, C., Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Jorgensen, C., & Noël, D. (2016). Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *Stem Cells*, *34*(2), 483–492. <https://doi.org/10.1002/stem.2254>
- Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W., & Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, *103*(12), 4619–4621. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>
- Mellier, G., Huang, S., Shenoy, K., & Pervaiz, S. (2010). TRAILing death in cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*(1), 93–112. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.12.002>
- Miyagawa, Y., Okita, H., Hiroshima, M., Sakamoto, R., Kobayashi, M., Nakajima, H., Katagiri, Y. U., Fujimoto, J., Hata, J. I., Umezawa, A., & Kiyokawa, N. (2011). A microfabricated scaffold induces the spheroid formation of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells and promotes efficient adipogenic differentiation. *Tissue Engineering - Part A*, *17*(3–4), 513–521. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0810>
- Mojsilović, S., Krstić, A., Ilić, V., Okić-Dordević, I., Kocić, J., Trivanović, D., Santibañez, J. F., Jovčić, G., & Bugarski, D. (2011). IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. *Cell and Tissue Research*, *346*(3), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1284-5>
- Mueller, S. M., & Glowacki, J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Cellular Biochemistry*, *82*(4), 583–590. <https://doi.org/10.1002/jcb.1174>
- Mueller-Klieser, W. (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *273*(4), C1109–C1123. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.4.C1109>
- Najar, M., Raicevic, G., Jebbawi, F., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., & Lagneaux, L. (2012). Characterization and functionality of the CD200-CD200R system during mesenchymal stromal cell interactions with T-lymphocytes. *Immunology Letters*, *146*(1–2), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.04.017>
- Nguyen, T., Gronthos, S., Arthur, A., & Hayball, J. (2013). EphB and ephrin-B interactions mediate human mesenchymal stem cell suppression of activated T-cells. *Experimental Hematology*, *41*(8), S73. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.05.285>
- Niibe, K., Ohori-Morita, Y., Zhang, M., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., & Egusa, H. (2020). A Shaking-Culture Method for Generating Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Spheroids With Enhanced Multipotency in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.590332>
- Nitzsche, F., Müller, C., Lukomska, B., Jolkkonen, J., Deten, A., & Boltze, J. (2017). Concise Review: MSC Adhesion Cascade—Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells*, *35*(6), 1446–1460. <https://doi.org/10.1002/stem.2614>
- Noh, M. (2012). Interleukin-17A increases leptin production in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochemical Pharmacology*, *83*(5), 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.010>
- Noone, C., Kihm, A., English, K., O’Dea, S., & Mahon, B. P. (2013). IFN- γ Stimulated Human Umbilical-Tissue-Derived Cells Potently Suppress NK Activation and Resist NK-Mediated Cytotoxicity In Vitro. *Stem Cells and Development*, *22*(22), 3003–3014. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0028>

- Normanton, M., Alvarenga, H., Hamerschlak, N., Ribeiro, A., Kondo, A., Rizzo, L. V., & Marti, L. C. (2014). Interleukin 7 Plays a Role in T Lymphocyte Apoptosis Inhibition Driven by Mesenchymal Stem Cell without Favoring Proliferation and Cytokines Secretion. *PLoS ONE*, *9*(9), e106673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106673>
- Noronha, N. de C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J. G., Rocha, J. L. M., Covas, D. T., Swiech, K., & Malmegrim, K. C. R. (2019). Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y>
- Oliveira, R. L., Chagastelles, P. C., Sesterheim, P., & Pranke, P. (2017). In Vivo Immunogenic Response to Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and the Role of Preactivated Mesenchymal Stem Cells Cotransplanted with Allogeneic Islets. *Stem Cells International*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9824698>
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Lutz, C., Lanz, T. V., Tritschler, I., Köppel, A., Tolosa, E., Hoberg, M., Anderl, J., Aicher, W. K., Weller, M., Wick, W., & Platten, M. (2009). Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via Interferon- β and protein kinase R. *Stem Cells*, *27*(4), 909–919. <https://doi.org/10.1002/stem.7>
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., & Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology*, *6*(11), 1133–1141. <https://doi.org/10.1038/ni1261>
- Park, I. S., Rhie, J. W., & Kim, S. H. (2014). A novel three-dimensional adipose-derived stem cell cluster for vascular regeneration in ischemic tissue. *Cytotherapy*, *16*(4), 508–522. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.08.011>
- Pasquier, J., Guerrouahen, B. S., Al Thawadi, H., Ghiabi, P., Maleki, M., Abu-Kaoud, N., Jacob, A., Mirshahi, M., Galas, L., Rafii, S., Le Foll, F., & Rafii, A. (2013). Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *Journal of Translational Medicine*, *11*(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-94>
- Peperzak, V., Veraar, E. A. M., Xiao, Y., Bąbała, N., Thiadens, K., Brugmans, M., & Borst, J. (2013). CD8+ T Cells Produce the Chemokine CXCL10 in Response to CD27/CD70 Costimulation To Promote Generation of the CD8+ Effector T Cell Pool. *The Journal of Immunology*, *191*(6), 3025–3036. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202222>
- Petrenko, Y., Syková, E., & Kubinová, Š. (2017). The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0558-6>
- 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), 4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>
- Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G. W., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., & Bartholomew, A. (2008). IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European Journal of Immunology*, *38*(6), 1745–1755. <https://doi.org/10.1002/eji.200738129>
- Potapova, I. A., Brink, P. R., Cohen, I. S., & Doronin, S. V. (2008). Culturing of Human Mesenchymal Stem Cells as Three-dimensional Aggregates Induces Functional Expression of CXCR4 That

- Regulates Adhesion to Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 13100–13107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800184200>
- Potapova, I. A., Gaudette, G. R., Brink, P. R., Robinson, R. B., Rosen, M. R., Cohen, I. S., & Doronin, S. V. (2007). Mesenchymal Stem Cells Support Migration, Extracellular Matrix Invasion, Proliferation, and Survival of Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells*, 25(7), 1761–1768. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0022>
- Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., & Vasandan, A. B. (2010). Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *PLoS ONE*, 5(2), e9016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009016>
- Prockop, D. J., & Oh, J. Y. (2012). Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation. *Molecular Therapy*, 20(1), 14–20. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.211>
- Rafei, M., Birman, E., Forner, K., & Galipeau, J. (2009). Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular Therapy*, 17(10), 1799–1803. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.157>
- Raposo, G., & Stahl, P. D. (2019). Extracellular vesicles: a new communication paradigm? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(9), 509–510. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0158-7>
- Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., & Le Blanc, K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Experimental Cell Research*, 305(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.12.013>
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>
- Renner, P., Eggenhofer, E., Rosenauer, A., Popp, F. C., Steinmann, J. F., Slowik, P., Geissler, E. K., Piso, P., Schlitt, H. J., & Dahlke, M. H. (2009). Mesenchymal Stem Cells Require a Sufficient, Ongoing Immune Response to Exert Their Immunosuppressive Function. *Transplantation Proceedings*, 41(6), 2607–2611. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.119>
- Rogulska, O., Vavrinova, E., Vackova, I., Havelkova, J., Gotvaldova, K., Abaffy, P., Kubinova, S., Sima, M., Rossner, P., Bacakova, L., Jendelova, P., Smolkova, K., & Petrenko, Y. (2025). The role of cytokine licensing in shaping the therapeutic potential of wharton’s jelly MSCs: metabolic shift towards immunomodulation at the expense of differentiation. *Stem Cell Research & Therapy*, 16(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s13287-025-04309-2>
- Rovira Gonzalez, Y. I., Lynch, P. J., Thompson, E. E., Stultz, B. G., & Hursh, D. A. (2016). In vitro cytokine licensing induces persistent permissive chromatin at the Indoleamine 2,3-dioxygenase promoter. *Cytotherapy*, 18(9), 1114–1128. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.05.017>
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., & Gerdes, H.-H. (2004). Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science*, 303(5660), 1007–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>
- Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 149(2), 353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x>
- Sackstein, R. (2005). The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Current Opinion in Hematology*, 12(6), 444–450. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000177827.78280.79>

- Schu, S., Nosov, M., O'Flynn, L., Shaw, G., Treacy, O., Barry, F., Murphy, M., O'Brien, T., & Ritter, T. (2012). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(9), 2094–2103. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01509.x>
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N., & Ren, G. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Research*, 20(5), 510–518. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.44>
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B., & Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*, 33(3), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.11.004>
- Shin, J. H., Shin, D. W., & Noh, M. (2009). Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochemical Pharmacology*, 77(12), 1835–1844. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.008>
- Shin, S., Lee, J., Kwon, Y., Park, K.-S., Jeong, J.-H., Choi, S.-J., Bang, S. I., Chang, J. W., & Lee, C. (2021). Comparative Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells Secretome from Adipose, Bone Marrow, Placenta and Wharton's Jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 845. <https://doi.org/10.3390/ijms22020845>
- Sivanathan, K. N., Rojas-Canales, D., Grey, S. T., Gronthos, S., & Coates, P. T. (2017). Transcriptome profiling of IL-17A preactivated mesenchymal stem cells: A comparative study to unmodified and IFN- γ modified mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1025820>
- Sivanathan, K. N., Rojas-Canales, D. M., Hope, C. M., Krishnan, R., Carroll, R. P., Gronthos, S., Grey, S. T., & Coates, P. T. (2015). Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function. *Stem Cells*, 33(9), 2850–2863. <https://doi.org/10.1002/stem.2075>
- Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(9), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>
- 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(5), 1283–1288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510511103>
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., & Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
- Sullivan, C. B., Porter, R. M., Evans, C. H., Ritter, T., Shaw, G., Barry, F., & Murphy, J. M. (2014). TNF α and IL-1 β influence the differentiation and migration of murine MSCs independently of the NF- κ B pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(4). <https://doi.org/10.1186/scrt492>
- Szabó, E., Fajka-Boja, R., Kriston-Pál, É., Hornung, Á., Makra, I., Kudlik, G., Uher, F., Katona, R. L., Monostori, É., & Czibula, Á. (2015). Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells and Development*, 24(18), 2171–2180. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0581>
- Tang, J.-M., Wang, J.-N., Zhang, L., Zheng, F., Yang, J.-Y., Kong, X., Guo, L.-Y., Chen, L., Huang, Y.-Z., Wan, Y., & Chen, S.-Y. (2011). VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovascular Research*, 91(3), 402–411. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr053>

- Valencia, J., Yáñez, R. M., Muntión, S., Fernández-García, M., Martín-Rufino, J. D., Zapata, A. G., Bueren, J. A., Vicente, Á., & Sánchez-Guijo, F. (2025). Improving the therapeutic profile of MSCs: Cytokine priming reduces donor-dependent heterogeneity and enhances their immunomodulatory capacity. *Frontiers in Immunology*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1473788>
- Vallabhaneni, K. C., Haller, H., & Dumler, I. (2012). Vascular Smooth Muscle Cells Initiate Proliferation of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes. *Stem Cells and Development*, *21*(17), 3104–3113. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0691>
- Vigo, T., Procaccini, C., Ferrara, G., Baranzini, S., Oksenberg, J. R., Matarese, G., Diaspro, A., Kerlero de Rosbo, N., & Uccelli, A. (2017). IFN- γ orchestrates mesenchymal stem cell plasticity through the signal transducer and activator of transcription 1 and 3 and mammalian target of rapamycin pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *139*(5), 1667–1676. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.004>
- Wang, C.-Y., Yang, H.-B., Hsu, H.-S., Chen, L.-L., Tsai, C.-C., Tsai, K.-S., Yew, T.-L., Kao, Y.-H., & Hung, S.-C. (2012). Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *6*(7), 559–569. <https://doi.org/10.1002/term.461>
- Wang, J., & Li, R. (2024). Effects, methods and limits of the cryopreservation on mesenchymal stem cells. In *Stem cell research & therapy* (Vol. 15, Issue 1, p. 337). <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03954-3>
- Wang, M., Crisostomo, P. R., Herring, C., Meldrum, K. K., & Meldrum, D. R. (2006). Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *291*(4), R880–R884. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00280.2006>
- Wang, S., Guo, L., Ge, J., Yu, L., Cai, T., Tian, R., Jiang, Y., Zhao, R. C., & Wu, Y. (2015). Excess Integrins Cause Lung Entrapment of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, *33*(11), 3315–3326. <https://doi.org/10.1002/stem.2087>
- Wu, Y., & Zhao, R. C. (2012). The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to myocardium. *Stem cell reviews and reports*, *8*(1), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9293-z>
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A., & Kosik, K. S. (2009). MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, *137*(4), 647–658. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.038>
- Xue, Q., Luan, X.-Y., Gu, Y.-Z., Wu, H.-Y., Zhang, G.-B., Yu, G.-H., Zhu, H.-T., Wang, M., Dong, W., Geng, Y.-J., & Zhang, X.-G. (2010). The Negative Co-Signaling Molecule B7-H4 Is Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Mediates its T-Cell Modulatory Activity. *Stem Cells and Development*, *19*(1), 27–38. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0076>
- Yang, F., Wang, S., Li, Y., Li, S., Liu, W., Li, Y., & Hu, H. (2022). Physical optimization of cell proliferation and differentiation using spinner flask and microcarriers. *AMB Express*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01397-8>
- Yang, L., Anderson, D. E., Baecher-Allan, C., Hastings, W. D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K., & Hafler, D. A. (2008). IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T H17 cells. *Nature*, *454*(7202), 350–352. <https://doi.org/10.1038/nature07021>
- Yin, J. Q., Zhu, J., & Ankrum, J. A. (2019). Manufacturing of primed mesenchymal stromal cells for therapy. *Nature Biomedical Engineering*, *3*(2), 90–104. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0325-8>

- Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O., & Ladman, A. J. (1977). A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Research*, 37(10), 3639–3643.
- Zhang, Q., Nguyen, A. L., Shi, S., Hill, C., Wilder-Smith, P., Krasieva, T. B., & Le, A. D. (2012). Three-dimensional spheroid culture of human gingiva-derived mesenchymal stem cells enhances mitigation of chemotherapy-induced oral mucositis. *Stem Cells and Development*, 21(6), 937–947. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0252>
- Zimmermann, J. A., & Mcdevitt, T. C. (2014). Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. *Cytotherapy*, 16(3), 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.09.004>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>

Online zdroje:

1: <https://www.ema.europa.eu/en/news/alofisel-withdrawn-eu-market>