

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Jan Kössl

**Lokální produkce cytokinů po léčbě poškozeného povrchu oka pomocí
kmenových buněk**

**Local production of cytokines after treatment with stem cells of damaged
ocular surface**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení

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

V Praze dne 13. 8. 2015

.....

podpis

Poděkování:

Chci poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za odborné vedení a pomoc při práci na experimentech a při psaní mé diplomové práce, za veškeré rady, ochotu a čas. Dále bych rád poděkoval Mgr. Petru Trošanovi za naučení základních technik potřebných k práci a za pomoc během prováděných experimentů. Moje díky patří také RNDr. Aleně Zajícové, CSc. za pomoc při experimentech a zpracování diplomové práce a všem z Oddělení transplantační imunologie. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé rodině a přítelkyni za podporu při psaní této práce a v průběhu celého studia.

Abstrakt

Poškození rohovky je jednou z nejčastějších příčin zhoršeného zraku nebo slepoty. Pokud je poškození oka rozsáhlé a zasahuje do oblasti limbu, niky limbálních kmenových buněk (limbal stem cells, LSC), dochází k jejich deficienci a tím ke ztrátě schopnosti přirozené regenerace rohovky. Dochází k invazi spojivkového epitelu, k zánětu a neovaskularizacím a rohovka se postupně stává neprůhlednou. Samotná transplantace rohovky k léčbě nestačí. Navíc při poškození obou očí je nutná transplantace limbu nebo LSC od alogenního dárce a takový zákrok je nutný podpořit systémovým a lokálním podáním imunosupresivních léků, které mají rozsáhlé vedlejší účinky. Nalezením vhodné autologní buněčné náhrady by bylo možné dávky imunosupresiv vysadit a tím tyto vedlejší účinky odstranit. Mesenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSC) představují vhodnou alternativu z důvodu svých imunomodulačních a diferenciacích vlastností. Z tukové tkáně nebo kostní dřeně lze získat dostatečné množství MSC.

Naším cílem bylo sledovat lokální produkci cytokinů a dalších molekul spojených se zánětem po chemickém poškození myší rohovky a po léčbě kmenovými buňkami transplantovanými pomocí nanovláknenného nosiče na poškozený povrch oka. Porovnali jsme terapeutický účinek transplantovaných MSC, izolovaných z tukové tkáně nebo kostní dřeně, a LSC, izolovaných z limbu, na lokální produkci cytokinů a na regeneraci rohovkového epitelu. Naše výsledky ukazují, že po této terapii dochází k inhibici lokálního zánětu a rohovkový epitel je regenerován rychleji než u neléčených rohovek.

Klíčová slova: Rohovka, limbální kmenové buňky, mesenchymální kmenové buňky, nanovláknenný nosič, prozánětlivé cytokiny, deficiencie limbálních kmenových buněk

Abstract

The damage of ocular surface represents one of the most common causes of decreased quality of vision or even blindness. If the injury is extensive and includes the region of limbus, niche of limbal stem cells (LSC), LSC deficiency occurs and the natural corneal regeneration is stopped. Conjunctival epithelium migrates into the injured area. Neovascularization, local inflammation and corneal opacity occur. Corneal transplantation is an insufficient treatment in such case. If the injury is bilateral, the allogenic limbal graft or LSC transplantation is required. In such cases systemic immunosuppressive drugs with many negative side-effects must be administered. The search for an adequate autologous substitution is important for avoid immunosuppressive medication. Mesenchymal stem cells (MSC) represent a perspective substitution for the reason of their immunomodulatory properties and the capability to differentiate in many cell types. There is possibility to isolate sufficient number of these cells from adipose tissue or bone marrow which are relatively easily accessible.

Our goal was to observe local production of cytokines and other molecules which are present in inflammatory reaction after the chemical burn of the murine cornea and after the treatment with stem cells growing on nanofiber scaffold. We compared therapeutic effects of MSC isolated from the adipose tissue or the bone marrow with LSC isolated from the limbal tissue on local cytokine production and we evaluated the corneal regeneration was affected after MSC and LSC transplantation. The results showed inhibition of local inflammatory reaction after the treatment with stem cells and more rapid corneal regeneration in stem cell-treated recipients.

Key words: Cornea, limbal stem cells, mesenchymal stem cells, nanofiber scaffold, proinflammatory cytokines, limbal stem cell deficiency

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Seznam použitých zkratk	8
2. Úvod	10
3. Cíl práce	11
4. Literární přehled	12
4.1 Poškození povrchu oka a LSCD	12
4.1.1 Povrch oka	12
4.1.2. Poškození povrchu oka	13
4.1.3 LSCD	13
4.2 Buňky vhodné k transplantaci při léčbě poškozeného povrchu oka	14
4.2.1. Buňky epitelu ústní sliznice (oral mucose epithelial cells, OMEC)	14
4.2.2 SC vlasového folikulu	15
4.2.3 Kmenové buňky zubní dřeně	15
4.3 Limbální kmenové buňky (LSC)	15
4.3.1 Charakterizace LSC.....	15
4.3.2 Znaky LSC.....	16
4.3.3 Diferenciace LSC v buňky rohovkového epitelu.....	16
4.3.4 Využití LSC pro léčbu poškozeného povrchu oka	17
4.4 Mesenchymální kmenové buňky (MSC)	18
4.4.1 Charakteristika MSC	18
4.4.2 Imunomodulační vlastnosti MSC	19
4.4.3 Využití MSC při léčbě poškozeného povrchu oka	24
4.5 Transplantace SC na poškozený povrch oka.....	24
5. Metody a materiál	26
5.1 Zvířata	26
5.2 Média a roztoky	26
5.3 Použité technické vybavení.....	26
5.4 Použitý software.....	27
5.5 Model poškození povrchu oka	27
5.6 Izolace a kultivace LSC	28
5.7 Izolace a kultivace MSC	28
5.8 Kultivace SC na nanovlákněném nosiči a transplantace SC na poškozený povrch oka ..	29
5.9 Odběr rohovky	30
5.10 Izolace mRNA	30

5.11 Reverzní transkripce	30
5.12 Real-time PCR	31
5.13 Stimulace SC pomocí LPS.....	32
5.14 Řezy rohovky a barvení preparátů	33
5.15 Průtoková cytometrie	33
5.16 Test metabolické aktivity SC	34
5.17 Diferenciace SC	34
5.18 Statistická analýza.....	35
6. Výsledky	36
6.1 Model poškození povrchu oka	36
6.1.1 Poškození rohovky	36
6.1.2 Lokální zánětlivá reakce po poškození rohovky	38
6.2 Charakterizace použitých SC	39
6.2.1 Fenotypová charakterizace SC	39
6.2.2 Diferenciace SC	41
6.2.3 Stanovení metabolické aktivity SC pomocí testu WST-1	43
6.2.4 Porovnání exprese genů pro znaky rohovky u použitých SC	44
6.3 Exprese imunomodulačních molekul u použitých SC po stimulaci LPS.....	46
6.4 Transplantace SC na poškozený povrch oka.....	48
6.4.1 Reparace rohovkového epitelu	48
6.5 Vliv transplantovaných SC na expresi genů pro cytokiny a další molekuly v poškozené rohovce a po terapii.....	49
7. Diskuze	53
8. Závěr	57
9. Seznam literatury	59

1. Seznam použitých zkratk

ABCG	ATP-binding cassette protein G, ATP-dependentní transportér ABCG2
Adn	adipsin
AD-MSC	adipose tissue derived-MSC, MSC izolované z tukové tkáně
AM	amniotic membrane, amniová membrána
APC	antigen presenting cells, buňky prezentující antigen
Bglap	Bone gamma carboxyglutamate protein, osteocalcin
BM-MSC	bone marrow derived-MSC, MSC izolované z kostní dřeně
CCR	C-C motif receptor, receptor pro C-C motiv
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
COX	cyclooxygenase, cyklooxygenáza
CXCR	C-X-C motif receptor, receptor pro C-X-C motiv
DC	dendritic cells, dendritické buňky
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium (v práci označení pro DMEM + 10 % FCS)
EGF	epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
FACS	fluorescence-activated cell sorting, třídění buněk na základě aktivace fluorescencí
FasL	Fas ligand
FCS	fetal calf serum, fetální telecí sérum
FGF	fibroblast growth factor, růstový faktor fibroblastů
GAPDH	glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HBSS	Hank's balanced salt solution, Hankův pufový roztok
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA	human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen
IDO	indolamine 2,3-dioxygenase, indolamin 2,3-dioxygenáza
IFN	interferon
IGF	insuline-like growth factor, insulínu podobný růstový faktor
IL	interleukin
iNOS	inducible NO syntase, inducibilní NO syntáza
K3	cytokeratine 3, cytokeratin 3
K12	cytokeratine 12, cytokeratin 12
Ker	keratocan

LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
LSC	limbal stem cells, limbální kmenové buňky
LSCD	LSC deficiency, deficiencie limbálních kmenových buněk
Lum	lumican
M1/M2	type I or II macrophages, makrofágy 1. nebo 2. typu
MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MSC	mesenchymal stem cells, mesenchymální kmenové buňky
NK	natural killer, přirozený zabíječ
OMECE	oral mucose epithelial cells, buňky epitelu ústní sliznice
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PDGF	platelet-derived growth factor, růstový faktor derivovaný z krevních destiček
PD-L	programmed death ligand, ligand buněčné smrti
PGE	prostaglandin E
PMCs	post mitotic cells, post mitotické buňky
Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, gama receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (médium)
SC	stem cells, kmenové buňky
Spp	secreted phosphoprotein, sekretovaný fosfoprotein, osteopontin
TAC	transient amplifying cells, přechodně se dělicí buňky
Tc	cytotoxic T (lymphocytes), cytotoxické T (lymfocyty)
TDC	terminally differentiated cells, terminálně diferencované buňky
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
Th	helper T (lymphocytes), pomocné T (lymfocyty)
TNF	tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy
Treg	regulatory T (lymphocytes), regulační T (lymfocyty)
TSG	TNF- α stimulated gene, TNF- α stimulovaný gen
VEGF	vascular endothelial growth factor, růstový faktor cévního endotelu
VEGFR	VEGF receptor, receptor pro VEGF
WST	water soluble tetrazolium, ve vodě rozpustné tatrazoliové soli

2. Úvod

Poškození povrchu oka je příčinou 25 % případů slepoty po celém světě. Pokud takové poškození zasahuje až do oblasti limbu, niky limbálních kmenových buněk (limbal stem cells, LSC) zodpovědných za fyziologickou regeneraci a reparaci rohovky, dojde k jejich deficienci (limbal stem cells deficiency, LSCD). Rohovku postupně překrývá spojivkový epitel, dochází k zánětlivé reakci, neovaskularizacím, postupnému zakalení povrchu oka a ke ztrátě zraku. Při jednostranném poškození je možné transplantovat rohovku od dárce. Zvýšení regenerace rohovky a zabránění invaze spojivkového epitelu lze podpořit transplantací části limbu odebraného ze zdravého oka pacienta. Další variantou je izolovat LSC ze zdravého limbu, kultivovat je a následně transplantovat pomocí vhodného nosiče na poškozenou rohovku. Dojde-li k poškození a LSCD obou očí není výše zmíněný postup možný. Po transplantaci rohovky bez limbu nebo LSC dochází k opětovnému zákalu a zneprůhlednění. Při použití limbu nebo LSC od vhodného dárce (kadaverozního nebo žijícího) je nutné jako u každé alotransplantace podávat imunosupresivní léky, které mají vedlejší účinky a pacienti musí být dlouhodobě sledováni. Hledá se proto vhodná autologní náhrada, kterou by bylo možné získat přímo od pacienta postiženého LSCD. Takovou náhradou by mohly být různé typy buněk odebrané z tkání pacienta jako např. kmenové buňky vlasového folikulu, epitelové buňky ústní sliznice, kmenové buňky zubní dřene a v neposlední řadě mesenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSC) odebrané z tukové tkáně (adipose tissue derived-MS, AD-MS) nebo kostní dřene (bone marrow derived-MS, BM-MS). Tyto zdroje MSC jsou poměrně snadno dostupné a ohrožení zdraví pacienta je během takových zákroků minimální.

MSC jsou multipotentní kmenové buňky (stem cells, SC) schopné diferencovat na buňky různých tkání včetně buněk exprimujících gen pro znak rohovkového epitelu cytokeratin K12 (K12). MSC mají schopnost migrace do poškozených tkání, kde se podílejí na regeneraci. Mají také rozsáhlé imunomodulační vlastnosti, pomocí kterých snižují proliferaci a aktivitu buněk adaptivní i přirozené imunity a směřují imunitní odpověď k protizánětlivé reakci. Těchto vlastností by bylo možné využít i během terapie poškozeného povrchu oka. Během takové terapie by bylo možné snížit nebo úplně vysadit dávky imunosupresivních léků, inhibovat zánět a příznivě ovlivnit reparaci a regeneraci rohovky.

3. Cíl práce

Po jednostranném poškození povrchu oka a vzniku LSCD je první volbou transplantace rohovky a autologní transplantace části limbu ze zdravého oka, která zajistí regeneraci nové rohovky od dárce. Další možností je kultivace LSC z limbu zdravého oka a jejich přenos na poškozenou rohovku pomocí vhodného nosiče. Při oboustranném poškození není tento postup možný a je potřeba použít limbální tkáň nebo LSC od alogenního dárce. S tímto krokem je spojené podávání imunosupresivních léků, které mají rozsáhlé vedlejší účinky. Vhodnou autologní náhradou by mohly být MSC, které se dají poměrně snadno izolovat z kostní dřeně nebo tukové tkáně, mají rozsáhlé imunomodulační vlastnosti jako např. tlumení lokálního zánětu. Cílem této práce bylo sledovat terapeutický účinek transplantovaných SC na rohovku poškozenou hydroxidem sodným (NaOH). Ke studiu léčebných účinků transplantovaných SC byla analyzována lokální exprese genů pro prozánětlivé cytokiny a další imunoregulační molekuly spojené se zánětem. Regenerace rohovkového epitelu byla sledována vizuálně a především analýzou exprese genu pro cytokeratin K12, který je znakem epitelu myší rohovky.

4. Literární přehled

4.1 Poškození povrchu oka a LSCD

4.1.1 Povrch oka

Povrch oka je tvořen spojivkou a rohovkou. **Spojivka** pokrývá viditelnou část skléry a vnitřní stranu víček. Je složena z vrstevnatého dlaždicového nerohovějícího epitelu, který obsahuje pohárkovité buňky a zároveň je ve spojivce přítomen i vrstevnatý cylindrický epitel.

Rohovka pokrývá 20 % předního povrchu oka. Je to průhledná, bezbarvá a bezcévná tkáň, která překrývá duhovku, zornici a přední komoru oční. Její světlolomné vlastnosti jsou důležité pro normální přenos světla na sítnici a pro zdravé vidění. Skládá se z předního epitelu rohovky (vrstevnatý dlaždicový nerohovějící epitel), který je z vnější strany pokryt vrstvou proteinů a lipidů. Pod epitelem se nachází Bowmanova membrána tvořená nepravidelně se křížícími kolagenními vlákny zalitými v extracelulární matrix. Nejsilnější vrstvou rohovky je stroma složené z pravoúhle uspořádaných fibril kolagenu, mezi kterými jsou přítomny keratocyty. Rohovkový endotel je jednovrstevný nerohovějící dlaždicový epitel s velkým obsahem mitochondrií a se značnou proteosyntézou. Produktem endotelu je Descemetova membrána nacházející se mezi rohovkovým stromatem a endotelem.

Rohovka není krevně ani lymfaticky zásobena. Tak je zamezeno transportu antigenů a buněk prezentujících antigen (antigen presenting cell, APC) do sekundárních lymfatických orgánů a rozvinutí imunitní odpovědi nebo průniku imunitních buněk do rohovky. Buňky ve všech vrstvách rohovky exprimují minimální množství proteinů hlavního histokompatibilního komplexu I a II (major histocompatibility complex, MHC). Produkce trombospondinu, receptoru pro růstový faktor cévního endotelu 1 (vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1) a angiostatinu inhibuje tvorbu endotelu cév a tím tvorbu krevních cév v rohovce (Gabison et al. 2004; Cursiefen et al. 2011). Buňky rohovkového epitelu a endotelu konstitutivně exprimují Fas ligand (FasL), jehož pomocí indukují apoptózu u efektorových T lymfocytů a dále ligand proteinu programované buněčné smrti-1 (programmed death-1 ligand, PD-L1), který tlumí T buněčnou odpověď a indukuje apoptózu T lymfocytů (Hori et al. 2006).

4.1.2. Poškození povrchu oka

Na světě je 285 milionů pacientů s poškozeným zrakem, z toho 39 milionů lidí je slepých a 25 % těchto případů je způsobeno poškozením rohovky (Pascolini and Mariotti 2012). Povrch oka může být poškozen přímo: mechanicky, tepelně a chemicky nebo nepřímo jako následek infekčního onemocnění (např. ulcerativní keratitida, trachom). Dalším mechanismem poškození rohovky jsou rohovkové dystrofie způsobené genetickou vadou nebo autoimunitním onemocněním (např. Steven-Johnsonův syndrom), během kterého dochází vlivem zánětu víček a okolních tkání k vaskularizaci rohovky a postupné ztrátě zraku.

Prognóza léčby zasažené rohovky záleží na rozsahu poškození. Rohovka je schopna se sama regenerovat pomocí migrace a diferenciací LSC z limbu. Jakmile dojde i k poškození této struktury, regenerace rohovky se zastavuje a postupně dochází k jejímu zneprůhlednění.

4.1.3 LSCD

Při rozsáhlém poškození rohovky dochází k zasažení větší části nebo celého limbu, k narušení přirozené regenerace rohovkového epitelu pomocí LSC, což vede k LSCD. Limbus neslouží pouze jako nika pro LSC, ale také jako bariéra proti migraci spojivkového epitelu. Po zničení limbu dochází k invazi spojivkového epitelu, který tvoří pro rohovku atypické prostředí. Postupně dochází k neovaskularizacím, chronickému lokálnímu zánětu, jizvení stromatu, ztenčení rohovky a k postupnému zakalení povrchu oka (Dua et al. 2009; Ordonez and Di Girolamo 2012).

4.1.3.1 Léčba LSCD

Transplantace rohovky je první volbou při poškození povrchu oka a používá se i při kosmetických nebo refrakčních vadách. Vzhledem k imunoprivilegite rohovky se jedná o jednu z neúspěšnějších a nejčastěji prováděných alogenních transplantací pevné tkáně, ale i přes tuto výhodu dochází k odhojení štěpů. Úspěšnost transplantace závisí na stavu původní rohovky a na shodě dárce a příjemce v lidském leukocytárním antigenu (human leukocyte antigen, HLA). Při předchozí neovaskularizaci rohovky lze předpokládat, že imunologická privilegita tkáně byla narušena a riziko rejekce štěpu je tak vyšší (Maddula et al. 2011). Taková situace nastává i během LSCD.

Pro úspěšnou transplantaci rohovky je potřeba mít zachovaný limbus, aby se nová rohovka mohla dále regenerovat. U LSCD je tato přirozená oprava zastavena a samotná

transplantace je neúčinná. Po čase dochází k opětovné invazi spojivkového epitelu a vzhledem k narušení imunologického privilegia rohovky je takový štěp náchylnější k odhojení (Maddula et al. 2011). Poté je nutno přistoupit k transplantaci buď autologního limbu nebo LSC izolovaných ze zdravého oka (Rama et al. 2010). Pokud je poškození limbu oboustranné, není takový postup možný. Jakákoliv alogenní transplantace musí být navíc podpořena silnou dávkou systémových imunosupresivních léků, které mají řadu vedlejších účinků.

Limbus je bohatě cévně zásoben a není tedy jako zbytek rohovky imunologicky privilegovaný a je potřeba použití imunosupresiv. Ačkoliv je od kadaverózního dárce možné odebrat celý limbus, v nedávné době se ukázalo, že transplantace části limbální tkáně od žijícího dárce je pro regeneraci rohovky a znovuzískání zraku výhodnější (Titiyal et al. 2015). V myším experimentálním modelu transplantace alogenního limbu docházelo k jeho odhojení, během kterého hrály důležitou roli pomocné lymfocyty 1 (Th1 lymfocyty). V odhojené tkáni byla zjištěna exprese genů pro inducibilní syntázu oxidu dusnatého (inducible NO syntase, iNOS) a Th1 cytokiny jako interleukin 2 (IL-2) a interferon γ (IFN- γ) společně s minimální expresí genů pro Th2 cytokiny (IL-4, IL-10). Použitím anti-CD4 protilátky bylo rejekci rohovky zabráněno (Lenčová et al. 2011). Dříve bylo na experimentálním modelu králíka ukázáno, že zásah do zdravého oka může vést k nezvratným změnám v regeneraci rohovky dárce a k částečné invazi spojivkového epitelu (Chen and Tseng 1991). V takovém případě by zásah do zdravého oka pacienta u unilaterální LSCD nebo při odběru limbu od žijícího dárce ohrozil zrak i ve zdravém oku. Vhodnou náhradou při bilaterální LSCD nebo v případech, kdy odebrání části limbu ze zdravého oka není žádoucí, by mohlo být použití autologních SC získaných z různých tkání pacienta.

4.2 Buňky vhodné k transplantaci při léčbě poškozeného povrchu oka

MSC a LSC jsou, vzhledem k zaměření diplomové práce, věnovány samostatné kapitoly, a proto následuje pouze krátký přehled buněk použitých v experimentech vzhledem k poškozenému povrchu oka a LSCD.

4.2.1. Buňky epitelu ústní sliznice (oral mucose epithelial cells, OMEC)

Ex vivo kultivované OMEC byly použity v několika terapiích LSCD u lidí s různou úspěšností od 43 % do 67 %. Po určité době po transplantaci docházelo k neovaskularizaci a invazi spojivkového epitelu na okrajích rohovky (Nishida et al. 2004). V dalším klinickém

testu byla transplantace úspěšná a i po dvou letech bez viditelného poškození nebo návratu LSCD. V tomto případě byly OMEC na rozdíl od předchozích pokusů kultivovány v médiu bez zvířecího séra a živné vrstvy (Kolli et al. 2014).

4.2.2 SC vlasového folikulu

Pokud jsou tyto buňky pěstovány v médiu z kultivovaných limbálních fibroblastů, dochází u nich *in vitro* k diferenciaci na buňky exprimující znaky rohovkového epitelu. Na myším modelu byla transplantace takovýchto buněk na poškozenou rohovku s LSCD úspěšná v 80 % případů, byla potlačena vaskularizace a růst spojivkového epitelu (Meyer-Blazejewska et al. 2011).

4.2.3 Kmenové buňky zubní dřeně

Po transplantaci SC izolovaných ze zubní dřeně na poškozenou rohovku králíka byla pozorována jejich diferenciaci v buňky exprimující znaky typické pro rohovku K3 a K12 (Gomes et al. 2009). Po kultivaci a diferenciaci na nanovláčném nosiči exprimovaly tyto buňky keratocan a keratan sulfát a byly pozorovány struktury podobné rohovkovému stromatu (Syed-Picard et al. 2015).

4.3 Limbální kmenové buňky (LSC)

4.3.1 Charakterizace LSC

LSC jsou malé nediferencované SC nacházející se v oblasti limbu mezi útvary označovanými jako Vogtovy palisády. Ty jsou tvořeny záhyby bazální membrány zasahující hluboko do limbálního epitelu. V roce 1971 byl poprvé popsán limbus jako oblast povrchu oka účastníci se regenerace rohovky (Davanger and Evensen 1971). Vogtovy palisády tvoří limbální epiteliální krypty, ve kterých se LSC nacházejí (Dua 2005). Cévně zásobená bazální membrána limbu zajišťuje pro tuto niku LSC dobré prokrvení, zásobení živinami a přísun růstových a diferenciacních faktorů. Důležitým prvkem je i extracelulární matrix propojující jednotlivé LSC (Li et al. 2007). Vogtovy palisády a přirozená pigmentace bazálního epitelu limbu chrání tyto SC před poškozením UV zářením (Echevarria and Girolamo 2010). LSC nejsou v této nise přítomny rovnoměrně, ale soustřeďují se hlavně v dolní a horní části limbu (Goldberg and Bron 1982).

Přítomnost SC zodpovědných za regeneraci rohovky byla později potvrzena u pacientů s poškozeným povrchem oka, u kterých docházelo k obnově epitelu od periferie rohovky směrem do středu (Dua et al. 1994).

Po poškození rohovky jsou LSC schopny rychle reagovat a nahradit chybějící buňky epitelu rohovky. Dochází u nich stejně jako u ostatních SC k asymetrickému dělení, kdy se jedna buňka diferencuje, odpoutává se od bazální membrány a stává se z ní přechodně dělící se buňka (transient amplifying cells, TAC), která se dále diferencuje a migruje do středu rohovky. Druhá dceřiná buňka zůstává v nice SC jako zásoba pro další dělení. TAC se dále diferencují v postmitotické buňky (postmitotic cells, PMC) a nakonec v terminálně diferencované buňky (terminally differentiated cells, TDC). V posledních dvou fázích se nejsou tyto buňky schopny dále dělit a pouze se diferencují (Lehrer et al. 1998).

LSC mají také imunomodulační vlastnosti. Jsou schopny inhibovat proliferaci lymfocytů a produkci prozánětlivých cytokinů aktivovanými T lymfocyty. V tomto směru se ukázaly podobně supresivní jako klasické regulační T lymfocyty (Treg) nebo MSC. LSC působí na T lymfocyty zatím neznámými solubilními faktory, ale nejedná se o stejné faktory jako u imunomodulace pomocí MSC (viz dále). Exprimují zvýšenou hladinu anti-apoptotických molekul jako Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, XIAP a survivin. Byla u nich nalezena zvýšená exprese RNA pro FasL a unikají rozpoznání a lyzi pomocí cytotoxických T lymfocytů (Tc lymfocytů) (Holan et al. 2010).

4.3.2 Znaky LSC

Pro LSC nebyl nalezen žádný jedinečný znak. Pro identifikaci lze použít kombinace intracelulárních znaků jako je transkripční faktor p63, převážně jeho izoforma $\Delta Np63\alpha$ (Pellegrini 2001) a ATP-dependentní transportér ABCG2 (ATP-binding cassette protein G 2). Naopak neexprimují znaky rohovky jako K3 (u myši není znakem rohovky), K12 a konexin 43 (Krulova et al. 2008; Ordonez and Di Girolamo 2012).

4.3.3 Diferenciace LSC v buňky rohovkového epitelu

Jak bylo popsáno výše, z LSC asymetrickým dělením vznikají TAC, které migrují ke středu rohovky a dále se diferencují. V limbu a v rohovce se tak nachází v tomto směru spektrum různě diferencovaných TAC, přičemž směrem k limbu si zachovávají svou schopnost dělení a směrem k centru rohovky tuto schopnost ztrácejí. V rohovce se z těchto

buněk postupně stávají buňky exprimující rohovkové znaky (Lehrer et al. 1998). Signály vedoucí z poškozené rohovky do limbu, podporující dělení a diferenciaci LSC nejsou dosud dobře známy. Růstový faktor hepatocytů (hepatocyte growth factor, HGF), růstový faktor fibroblastů β (fibroblast growth factor β , FGF- β) a transformující růstový faktor α a β (transforming growth factor α a β , TGF- α a TGF- β) jsou spojovány s modulací proliferace a růstu buněk očního povrchu (Li and Tseng 1995). Dalším takovým faktorem je inzulinu podobný růstový faktor I (insulin-like growth factor I, IGF-I), který je zatím jediným známým růstovým faktorem indukujícím expresi K12 u diferencujících se LSC (Trosan et al. 2012). IGF-I je produkován v rohovce. Po poškození povrchu oka dochází ke snížení exprese receptorů pro tento růstový faktor u epitelu rohovky, aby nemohl být vychytáván a mohl se dostat až do oblasti limbu, kde podporuje diferenciaci LSC. Samotnou proliferaci LSC, bez diferenciaci na buňky exprimující K12, vyvolává epidermální růstový faktor (epidermal growth factor, EGF) a FGF- β (Trosan et al. 2012).

4.3.4 Využití LSC pro léčbu poškozeného povrchu oka

Na zvířecích modelech byla pozorována LSCD po odstranění nebo rozsáhlém poškození limbu. Na těchto, převážně králičích, modelech byly zkoumány možnosti transplantace jak limbu, tak autologních nebo alogenních LSC (Chen and Tseng 1991; Gimeno et al. 2007).

Pellegrini et al. poprvé kultivovali LSC z části odebraného limbu a transplantovali tyto SC dvěma pacientům s jednostrannou LSCD. Jeden pacient podstoupil po dvou letech biopsii této ošetřené rohovky a ta vykazovala veškeré znaky opraveného rohovkového epitelu (Pellegrini et al. 1997). V roce 2010 proběhla klinická studie, během které byly transplantovány pomocí fibrinového lepidla LSC osmi pacientům. Před aplikací bylo nutné chirurgicky očistit rohovku od invazivního spojivkového epitelu. Nebyla zaznamenána neovaskularizace ani zánět, docházelo k zprůhlednění rohovky a k navrácení zraku (Rama et al. 2010). V další studii bylo léčeno dvě stě pacientů s unilaterální LSCD pomocí transplantace LSC kultivovaných z části limbu získaného ze zdravého oka. U 71 % takto ošetřených očí byly rohovky bez cév a kompletně pokryté rohovkovým epitelem (Sangwan et al. 2011).

Při bilaterálním poškození LSCD je nutno použít alogenní limbální tkáň nebo alogenní LSC. V některých studiích byla po delší době od transplantace detekována pouze DNA epitelových buněk příjemce. LSC tak nejspíše působily pouze jako buňky produkující chemotaktické molekuly pro progenitorové buňky, které cirkulovaly v periferní krvi po

poškození rohovky (Sharpe et al. 2007). Jak bylo popsáno výše, po alogenní transplantaci je nutné použít imunosupresivní léky a výsledek i přes toto opatření není jistý. Hledá se proto buněčná autologní náhrada, po jejíž transplantaci by bylo možné omezit nebo úplně vysadit imunosupresiva. Bohatým zdrojem vhodných autologních buněk by kromě výše popsaných buněk mohly být MSC.

4.4 Mesenchymální kmenové buňky (MSC)

MSC jsou multipotentní SC podobné fibroblastům schopné diferenciaci v buňky různých tkání a jsou tedy předmětem výzkumu jako potencionální léčba různých nemocí a defektů. Původně byly tyto buňky identifikovány jako multipotentní stromální prekurzorové buňky Friedensteinem et al. (1966). Dnes je známo, že MSC tvoří heterogenní populaci buněk s imunomodulačními a diferenciacními vlastnostmi a lze je izolovat z mnoha tkání těla. Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii v roce 2005 nazvala tyto buňky jako multipotentní mesenchymální stromální buňky. Za mesenchymální kmenové buňky jsou považovány jen takové, které splňují určitá kritéria pro SC popsaná dále. Zkratka MSC je používána u obou typů buněk (Dominici et al. 2006).

4.4.1 Charakteristika MSC

4.4.1.1 Zdroje MSC

MSC se nacházejí v mnoha tkáních, ve kterých s největší pravděpodobností plní úlohu při reparaci a regeneraci. Poprvé byly izolovány a kultivovány z kostní dřeně (Friedenstein et al. 1970), jedná se o nejčastější zdroj těchto SC. Později byly MSC izolovány z Whartonova rosolu pupečnicku (Wang et al. 2004), pupečnickové krve (Lee et al. 2004), placenty (Igura et al. 2004), kosterního svalu (Williams et al. 1999), zubní dřeně (Gronthos et al. 2000) nebo z rohovky a limbu (Garfias et al. 2012). Výhodou MSC z kostní dřeně je kromě velkého počtu i možnost jejich použití k autologní transplantaci. Získání kostní dřeně je poměrně velký a bolestivý lékařský zásah. Jako vhodná alternativa se ukázaly MSC získané liposukcí z tukové tkáně (Rodriguez et al. 2005).

4.4.1.2 Povrchové znaky MSC

MSC nemají žádný specifický znak a k jejich identifikaci se používá souhrn pozitivních a negativních znaků společně s fenotypem a diferenciacními vlastnostmi.

Vzhledem k rozdílným způsobům kultivace a specifikace těchto buněk, kvůli kterým bylo složité porovnávat jednotlivé experimenty a výsledky, stanovila Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii tři kritéria, podle kterých mohou být lidské MSC definovány. Buňky musí být adherentní k plastu za standardních kultivačních podmínek, exprimují diferenciační antigen 73 (cluster of differentiation 73, CD73) (5'-nukleotidáza), CD105 (součást TGF- β 1 receptoru), CD90 (Thy-1 protein účastnící se mezibuněčných interakcí) a naopak neexprimují znaky CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79 nebo CD19 a neexprimují HLA-DR (Dominici et al. 2006). Jednotlivé znaky se mohou lišit vzhledem k tkáni nebo organismu, ze kterého byly MSC izolovány.

MSC kontinuálně exprimují nízkou hladinu MHC I. MHC II je exprimován až po stimulaci pomocí IFN- γ . Kostimulační molekuly CD80, CD86 a CD40 chybí úplně. To poukazuje na možné použití takových buněk k alotransplantacím bez rozsáhlé imunosuprese příjemce (Le Blanc et al. 2003).

MSC jsou schopny migrovat do místa poškození. Exprimují několik receptorů pro chemokiny jako receptor C-C motivu 6 (C-C motif receptor 6, CCR 6), CCR9, receptor C-X-C motivu 3 (C-X-C motif receptor 3, CXCR 3) a CXCR6 (Chamberlain et al. 2008). Dalším je CCR7 receptor pro SLC/CCL21. Po vpravení tohoto chemokinu pod poraněnou kůži myši docházelo k migraci MSC do místa poškození a k urychlenému hojení (Sasaki et al. 2008). MSC exprimující CCR7 vpravené do periferní krve mohou migrovat do sekundárních lymfatických orgánů, čímž je podpořen jejich imunomodulační účinek a pomocí suprese lymfocytů mohou prodloužit přežití štěpu v myším modelu reakce štěpu proti hostiteli (Li et al. 2014). Po poškození myší rohovky byla pozorována zvýšená cirkulace rekrutovaných MSC v krvi a zvýšená produkce chemoatraktantů substance P a SDF-1 jak v poškozené rohovce, tak v periferní krvi. Intravenózně vpravené MSC migrovaly pouze do poškozeného oka a docházelo k obnově rohovkového epitelu (Lan et al. 2012). MSC stimulované pomocí IFN- γ a vpravené intravenózně do myši migrovaly do poškozené rohovky, kde účinně inhibovaly produkci prozánětlivých molekul IL-1, IL-6 a NO (Javorkova et al. 2014).

4.4.2 Imunomodulační vlastnosti MSC

MSC nejsou kvůli chybějícím koreceptorům CD80, CD86 a CD40 schopny prezentovat antigen T lymfocytům. Po stimulaci IFN- γ exprimují MSC FasL, pomocí kterého jsou MSC schopné zabít T lymfocyty, které MSC rozpoznají. MSC mohou být,

vzhledem k těmto vlastnostem a vzhledem k malé expresi MHC I a nepřítomnosti MHC II, označovány za imunoprivilegované. MSC na svém povrchu exprimují mnoho molekul, které jsou důležité pro mezibuněčný kontakt a jsou tak schopny ovlivnit proliferaci nebo funkce buněk. MSC inhibují proliferaci a aktivitu T buněk, B buněk, NK buněk, makrofágů a DC a snižují expresi cytokinů (Aggarwal 2005; Mazar et al. 2009).

4.4.2.1 Produkce faktorů zodpovědných za imunomodulační vlastnosti MSC

Kromě mezibuněčného kontaktu produkují MSC molekuly zodpovědné za ovlivnění imunitních pochodů v místě působení.

Mezi tyto molekuly účastníci se imunomodulace patří indolamin 2,3-dioxygenáza (IDO) a iNOS. iNOS je syntetizována především myšimi MSC, zatímco IDO je tvořena ve větším množství lidskými MSC (Ren et al. 2008). MSC spontánně produkují TGF- β . V prostředí poškozené tkáně s vyšším výskytem IL-1, faktoru nádorové nekrózy α (tumor necrosis factor α , TNF- α) a IFN- γ je tato produkce zvýšená. Po stimulaci prozánětlivými faktory MSC produkují další růstové faktory jako HGF, růstový faktor krevních destiček (platelet derived growth factor, PDGF), VEGF a IGF-I, které napomáhají regeneraci tkáně (Yoon et al. 2010). Bylo zjištěno, že MSC mají větší imunosupresivní schopnost po stimulaci IFN- γ v kombinaci s IL-1 nebo TNF- α . Tyto cytokiny vedou k větší expresi iNOS u myších MSC a k produkci leukocytárních chemokinů, které přitahují T lymfocyty, B lymfocyty, ale i buňky prezentující antigen do místa výskytu MSC. Tam zvýšená hladina NO tlumí imunitní funkce těchto lymfocytů (Ren et al. 2008). Po stimulaci prozánětlivými cytokiny (IL-1, IL-2, IFN- γ a TNF- α) nebo pomocí lipopolysacharidu (LPS) produkovaly MSC zvýšenou hladinu IL-6. Naopak protizánětlivé cytokiny (TGF- β a IL-10) podpořily produkci TGF- β (Svobodova et al. 2012).

Jako další imunomodulační faktory se uplatňuje prostaglandin E2 (PGE2), IL-6, IL-10 nebo u lidí HLA-G5. PGE2 je eikosanoid syntetizovaný z kyseliny arachidonové pomocí cyklooxygenáz (cyclooxygenase, COX) a prostaglandin syntázy. COX se vyskytuje v buňkách ve dvou formách jako COX-1 a COX-2. Obě formy jsou konstitutivně syntetizovány MSC, ale expresi COX-2 lze zvýšit stimulací pomocí TNF, IFN- γ nebo TLR3 (Waterman et al. 2010).

4.4.2.2 Vliv MSC na T lymfocyty

Jedním ze způsobů ovlivnění proliferace a aktivity T lymfocytů pomocí MSC je produkce NO. U myších MSC produkci NO zajišťuje iNOS, která je exprimována po stimulaci IFN- γ v kombinaci s IL-1 nebo TNF- α . Tento mechanismus ovlivňuje jak CD4+, tak CD8+ T lymfocyty (Ren et al. 2008). U lidských MSC je iNOS exprimována v minimálním množství, po stimulaci IFN- γ je exprimován gen převážně pro enzym IDO, který redukuje množství tryptofanu, aminokyseliny důležité pro proliferaci T lymfocytů (Ren et al. 2008; Li et al. 2014). Bylo zjištěno, že jedním z hlavních mechanismů inhibice proliferace T lymfocytů je zastavení jejich buněčného cyklu v G0/G1 fázi. Dochází nejen k inhibici proliferace T lymfocytů, ale i k zastavení produkce IFN- γ . Tato schopnost je u MSC vyvolána po stimulaci právě IFN- γ (Krampera et al. 2006).

MSC také ovlivňují diferenciaci naivních T buněk v Th17 nebo Treg lymfocyty. Směr vývoje závisí na produkci TGF- β a IL-6. Během produkce TGF- β dochází k přednostnímu vývoji Treg, pokud MSC produkují TGF- β společně s IL-6 dochází k vývoji prozánětlivých Th17 lymfocytů (Svobodova et al. 2012; Alawad et al. 2015). Mezibuněčný kontakt s alogenními T lymfocyty (společně s přítomností IL-10) je nutný k sekreci solubilního HLA-G5 u lidí, který inhibuje proliferaci T lymfocytů a naopak podporuje diferenciaci CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Treg lymfocytů (Selmani et al. 2008). MSC mohou také napomáhat k diferenciaci Th17 lymfocytů na Treg lymfocyty. U MSC byla popsána schopnost indukovat produkci IL-10 a expresi transkripčního faktoru FoxP3 u Th17 lymfocytů. Po kontaktu s Th17 lymfocyty MSC inhibují jejich produkci cytokinů jako IL-17, IL-22 a IFN- γ (Ghannam et al. 2010). MSC dále regulují počet Th1 a Th2 lymfocytů. Zatímco u Th1 inhibují efektorové funkce a dochází ke snížení produkce IFN- γ , vývoj Th2 lymfocytů podporují tím, že např. dendritické buňky (dendritic cell, DC) po ovlivnění MSC produkují více IL-10. U samotných Th2 dochází také ke zvýšení produkce IL-10 a IL-4. Tímto způsobem mohou MSC posouvat rovnováhu na stranu protizánětlivé imunitní odpovědi (Aggarwal 2005; Bouffí et al. 2010). Melief et al. (2013) popsali, že v indukci Treg lymfocytů pomocí MSC jsou nepostradatelné monocyty a že MSC podporují diferenciaci těchto monocytů v makrofágy typu II (M2), které produkují IL-10 a CCL18. MSC dále produkcí PGE2 inhibují aktivaci T lymfocytů zprostředkovanou receptorem T lymfocytů. Tato produkce PGE2 je závislá na přítomnosti IL-6 (Bouffí et al. 2010). MSC jako imunoprivilegované buňky unikají rozpoznání hostitelskými T lymfocyty a jsou schopny spustit u těchto buněk FasL/Fas zprostředkovanou apoptózu (Mazar et al. 2009).

4.4.2.3 Vliv MSC na B lymfocyty

MSC inhibují expresi receptorů CXCR4, CXCR5 a CCR7 pro chemokiny u B lymfocytů, zatímco exprese jejich kostimulačních molekul zůstává nezměněná (Cvija et al. 2012). Ztrátou exprese těchto receptorů je zabráněno B lymfocytům ve zrání, v migraci do Peyerových plaků a ve vstupu do sekundárních lymfoidních orgánů. Mechanismem inhibice proliferace je zastavení buněčného cyklu B buněk v G0/G1 fázi podobně jako u T lymfocytů pomocí mezibuněčného kontaktu. Tyto inhibiční vlastnosti MSC se projevují i po stimulaci IFN- γ , což nejspíše poukazuje na roli enzymu IDO (Krampera et al. 2006). MSC inhibují proliferaci B lymfocytů a zároveň produkci protilátek IgG a IgM (Asari et al. 2009). V jiném pokusu s myšmi MSC inhibovaly tyto buňky proliferaci, aktivaci a sekreci IgG B lymfocyty. MSC produkci IgG nejen inhibovaly, ale i stimulovaly, a to převážně pomocí produkce IL-6. Záleží na síle podnětu k produkci nebo tohoto imunoglobulinu (Rasmusson et al. 2007). Ukázalo se, že pro inhibici produkce protilátek a proliferace B lymfocytů pomocí MSC je důležitá přítomnost IFN- γ (Rosado et al. 2015).

4.4.2.4 Vliv MSC na NK buňky

Vliv MSC na NK buňky se vyznačuje snížením produkce IFN- γ , snížením proliferace NK buněk, změnou jejich fenotypu a snížením cytotoxicity vůči cílovým buňkám. Tato inhibice je větší při působení na klidové NK buňky než na aktivované. MSC unikají NK zprostředkované lyzi tím, že snižují produkci IL-2 a IL-15 T-lymfocyty, které jsou nutné k aktivaci NK buněk. Naopak NK buňky již aktivované pomocí IL-2 a IL-15 jsou schopné MSC rozpoznat a zničit. Inhibiční schopnosti MSC závisí na buněčném kontaktu i na solubilních faktorech, mezi které patří PGE2 a TGF- β (Le Blanc and Davies 2015).

4.4.2.5 Vliv MSC na dendritické buňky (DC)

MSC inhibují maturaci monocytů, a tedy jejich diferenciaci na DC. Dále snižují expresi kostimulačních molekul pro naivní T lymfocyty, čímž je zabráněno jejich maturaci a je pozorována snížená produkce prozánětlivých cytokinů (Jiang et al. 2005). MSC blokují přímým buněčným kontaktem DC buňky v G0 fázi buněčného cyklu (Ramasamy et al. 2007). MSC mohou také ovlivnit poměr mezi plazmocytoidními a myeloidními DC. U plazmocytoidních buněk zvyšují produkci IL-10, u myeloidních naopak snižují produkci TNF- α (Aggarwal 2005). MSC ovlivňují DC buňky přímým kontaktem, ale i solubilními faktory. Mezi ty nejdůležitější patří PGE2, který hraje hlavní roli při inhibici diferenciaci

monocytů v DC (Spaggiari et al. 2009). MSC také brání migraci DC do lymfatických uzlin snížením exprese CCR7 u DC (Chiesa et al. 2011). MSC z pupečnickové krve mohou pomocí IL-6 diferencovat DC v buňky s tolerogenním fenotypem, u kterých je zvýšena produkce IL-10, což vede k indukci Treg lymfocytů a k Th2 imunitní odpovědi (Deng et al. 2014). MSC mohou indukovat diferenciaci myeloidních DC na nezralé DC snížením počtu kostimulačních a antigen prezentujících molekul těchto DC (Zhang et al. 2009).

4.4.2.6 Vliv MSC na makrofágy

Makrofágy mohou být aktivovány klasickou cestou (vznik makrofágů typu I, M1) nebo alternativně (vznik M2 populace). M1 populace makrofágů dále svou produkcí solubilních faktorů (TNF- α , IL-6, IL-12) a iNOS směřují reakce k zánětlivé Th1 imunitní odpovědi, M2 (produkce IL-10) k Th2 protizánětlivé odpovědi. Přidáním MSC ke kultuře makrofágů dochází ke zvýšení exprese znaku CD206 protizánětlivých M2 makrofágů. Tyto M2 produkují zvýšené množství IL-10 a produkce IL-12 a TNF- α je snížena (Kim and Hematti 2009). Makrofágy mění svůj imunologický profil na protizánětlivý po působení MSC. Dochází k tomu mezibuněčným kontaktem, ale i produkcí solubilních faktorů jako PGE2, který inhibuje produkci TNF- α , IL-1, IL-6 a iNOS u již aktivovaných makrofágů. Takto diferencované makrofágy produkují větší množství protizánětlivých cytokinů (IL-10, IL-4) a mají vyšší schopnost fagocytózy apoptotických buněk, čímž napomáhají regeneraci a opravě poškozených tkání (Maggini et al. 2010). MSC mohou indukovat fenotyp M2 z monocytů vlivem produkce IL-6, PGE2 a IDO (Melief et al. 2013). Zvýšená produkce IFN- γ a TNF- α T lymfocyty vede u MSC ke zvýšení exprese COX-2 a IDO, což dále podporuje polarizaci makrofágů na M2 fenotyp (Bernardo and Fibbe 2013). MSC aplikované na kožní alogenní štěp pomocí nanovláknenného nosiče snížily počet infiltrovaných makrofágů do štěpu a navíc byla zaznamenána zvýšená produkce IL-10 těmito makrofágy (Hajkova et al. 2015).

4.4.2.7 Imunomodulace pomocí TNF- α stimulovaného genu-6 (TSG-6) produkovaného MSC

Stimulované MSC mohou modulovat zánět také pomocí exprese TSG-6. K produkci tohoto proteinu dochází po stimulaci prozánětlivými cytokiny, a to především IL-1 a TNF- α . Zvýšená hodnota proteinu TSG-6 byla zjištěna u pacientů s různými druhy onemocnění od bakteriální sepse až po autoimunitní defekty. Po podání samotného TSG-6 proteinu u modelu poškozené rohovky docházelo ke značnému zprůhlednění rohovky, k inhibici infiltrace

neutrofilů a k zastavení neovaskularizace (Oh et al. 2010). TSG-6 také zlepšuje hojení ran inhibicí aktivace makrofágů. Potlačuje tak v místě poškození zánět a fibrózu (Qi et al. 2014).

4.4.3 Využití MSC při léčbě poškozeného povrchu oka

MSC mohou být, vzhledem ke svým imunomodulačním vlastnostem, vhodným kandidátem k transplantaci na poškozený povrch oka. MSC jsou schopny diferenciaci v rohovkový epitel jak *in vitro*, tak *in vivo*. Po kultivaci králíčích MSC s LSC v médiu z kultivovaného limbálního epitelu nebo po transplantaci na poškozenou rohovku exprimovaly tyto buňky znak rohovky K3 (Gu et al. 2009, Rohaina et al. 2014). Myší MSC kultivované v médiu z buněk rohovkového stromatu exprimovaly K12. Po transplantaci na poškozený povrch oka docházelo k zprůhlednění rohovky a k ústupu neovaskularizace (Jiang et al. 2010). Myší MSC z kostní dřeně přežívaly ve stromatu rohovky bez zjevných patologií a získaly fenotyp keratocytů (Liu et al. 2012).

V roce 2006 byly poprvé aplikovány lidské MSC na poškozený povrch oka potkana pomocí amniové membrány (amniotic membrane, AM). Byla pozorována regenerace rohovky, ale ta byla spíše prokázána inhibicí zánětu a angiogeneze než transdiferenciací MSC v rohovkový epitel (Ma et al. 2006). Podobné změny byly pozorovány i po stejné aplikaci potkaních MSC kultivovaných s buňkami rohovkového stromatu (Jiang et al. 2010). Syngenní MSC byly transplantovány na poškozený povrch oka myši pomocí nanovláknenného nosiče (Zajicova et al. 2010). Byly také vpraveny pod dříve transplantovanou AM na oku králíka (Reinshagen et al. 2011). MSC z lidské kostní dřeně byly kultivovány v limbálním médiu po dobu 10 dní a přeneseny na poškozenou rohovku s LSCD (Rohaina et al. 2014). Ve všech těchto experimentech byla pozorována regenerace rohovky, utlumení zánětu a snížení vaskularizace. Během léčby poškození povrchu oka u králíka byly tyto terapeutické účinky BM-MSD srovnatelné s LSC (Holan et al. 2015).

4.5 Transplantace SC na poškozený povrch oka

SC nemohou být aplikovány přímo na rohovku vzhledem k neustálému omývání povrchu oka slzami. Je proto nutné použít vhodný nosič, na kterém lze SC kultivovat a následně transplantovat na oko.

AM se používá i při samotné transplantaci rohovky. AM přirozeně přispívá k urychlenému hojení, k potlačení neovaskularizace a zánětu, a tím snižuje riziko odhojení transplantátu. Těchto vlastností lze využít i pro transplantaci SC. Autologní LSC kultivované

na AM a následně transplantované na poškozenou rohovku napomáhají obnovit průhlednost rohovky a reepitelizují povrch oka (Basu et al. 2012). V porovnávací studii léčby bilaterální LSCD vykazovaly autologní i alogenní LSC transplantované na AM lepší výsledky než alogenní limbus (Borderie et al. 2014). MSC transplantované pomocí AM na poškozenou rohovku myši urychlovaly regeneraci očního povrchu a obnovu rohovkového epitelu (Rohaina et al. 2014) Obdobné výsledky byly získány, pokud byly MSC vpraveny pod již transplantovanou AM (Reinshagen et al. 2011).

Jako další způsob uchycení SC na poškozenou rohovku je použití fibrinového lepidla. Tohoto nosiče bylo s dobrými výsledky využito již v dříve zmíněné klinické studii léčby LSCD pomocí autologních LSC (Rama et al. 2010). Fibrinové lepidlo je stále používáno jak v klinické terapii, tak v experimentálních modelech poškození rohovky (Nakamura et al. 2015).

Pellegrinni et al. (1997) použili k transplantaci LSC na poškozenou rohovku kontaktní čočky. Limbální a spojivkové epitelové buňky kultivované na kontaktních čočkách exprimovaly znaky rohovky a navíc produkovaly faktory napomáhající přirozené regeneraci a reparaci rohovkového epitelu (Di Girolamo et al. 2006). V nedávné době bylo popsáno, že LSC kultivované na kontaktních čočkách úspěšně migrovaly na poškozenou rohovku během léčby LSCD u králíka, kde částečně obnovily rohovkový epitel (Brown et al. 2014).

Nanovláknenné nosiče představují jednu z nadějných alternativ. Jejich trojrozměrná struktura napodobuje extracelulární matrix a může vytvořit niku, ve které kultivované SC mohou přežít a uchovat si své vlastnosti. Takové nosiče mohou být připraveny z přírodních polymerů jako kolagenu a chitosanu nebo ze syntetických polymerů, kterým je např. polyamid. Nosič může být připraven způsobem, aby nesl farmakologické látky jako imunosupresiva nebo antibiotika, které mohou příznivě ovlivnit terapii (Holan et al. 2011; Sirc et al. 2012). LSC a MSC kultivované na nanovláknenném nosiči tvoří okolo vláken pseudopodie a po transplantaci na poškozený povrch oka migrují na rohovku, kde tlumí lokální zánět (Zajicova et al. 2010). MSC transplantované pomocí nanovláknenného nosiče na poškozenou rohovku králíka inhibují zánět způsobený oxidativním poškozením pomocí NaOH (Cejkova et al. 2013).

5. Metody a materiál

5.1 Zvířata

V pokusech byly použity samice myšního kmene BALB/c. Zvířata ve věku 2 - 3 měsíce pocházela z chovu Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v. v. i. (ÚMG AV ČR)

5.2 Média a roztoky

Pro izolaci a kultivaci MSC bylo používáno Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), do kterého bylo přidáno 10 % tepelně inaktivovaného fetálního telecího séra (fetal calf serum, FCS, Gibco, Saranac, NY), antibiotika streptomycin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) a penicilin (100 U/ml, Sigma-Aldrich) a HEPES pufr (10mM, Sigma-Aldrich). Toto médium je dále označováno pouze jako DMEM. Pro izolaci MSC z tukové tkáně byl použit 1% roztok kolagenázy I (Sigma-Aldrich) a Hankův pufrový roztok (HBSS, Hank's balanced salt solution, ÚMG AV ČR) s hořečnatými a vápenatými ionty.

LSC byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640, Sigma-Aldrich), do kterého bylo přidáno 10 % inaktivovaného FCS (Gibco), antibiotika (streptomycin a penicilin o stejné koncentraci jako u DMEM) a HEPES pufr (10 mM, Sigma-Aldrich). Dále jen RPMI médium.

Pro izolaci SC, transplantace a FACS analýzy byl používán fosfátový pufr (PBS, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄ a 1,44 Na₂PO₄ v 1 litru destilované vody, pH = 7,2) připravený v ÚMG AV ČR). Pro izolaci LSC byl používán 0,5% roztok trypsinu (ÚMG AV ČR).

Anestetikum Calyptol (xylozin hydrochloridum, 20 mg/ml, Gedeon Richter Plc., Budapešť, Maďarsko) bylo namícháno v poměru 1:10 s fyziologickým roztokem (ÚMG) do objemu 10 ml. Anestetikum Rometar (ketamin hydrochloridum 50 mg/ml, Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, ČR) bylo namícháno v poměru 1:5 s fyziologickým roztokem do 10 ml.

5.3 Použité technické vybavení

- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR na PCR a RT (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Centrifuga Hettich Universal 32 (Hettich, Beverley, ME)

- Centrifuga Hettich Universal 320 (Hettich)
- Centrifuga Hettich Universal 320R (Hettich)
- Cyclor PTV-200 (MJ research, Warertoen, MA)
- Cyclor StepOne Plus RT-PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)
- ELISA reader Sunrise (TECAN, Männensdorf, Švýcarsko)
- CO₂ Inkubátor (SANYO electric, Osaka, Japonsko)
- Invertovaný mikroskop Olympus IX81 vybavený kamerou Hamatsu ORCA C4742-80-12AG (Olympus, Munster, Německo)
- Laminární box Clean Air (Telstar, Woerden, Holandsko)
- Minicentrifuga Cleaver (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK)
- Operační mikroskop Leica (Wild Heerbrugg - Leitz, Heerbrugg, Švýcarsko)
- Optický mikroskop Olympus CKX31 (Olympus)
- Optický mikroskop Olympus CKX41 (Olympus)
- Průtokový cytometr LSR II (BD, Franklin Lakes, NJ)
- Spektrofotometr Nanodrop ND 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, DE)
- Vodní lázeň TE-10D Tempunit (Techne, Minneapolis, MN)
- Vortex Lab dancer (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- Zmrazovací mikrotom Leica CM3050 (Leica Microsystems, Nussloch, Německo)

5.4 Použitý software

- StepOne Software v2.2 k ovládání a vyhodnocení RT-PCR
- Microsoft Excel k vyhodnocení RT-PCR
- GraphPad v6.0
- FlowJo | Single Cell Analysis Software
- KIM v5.26 k ovládání a vyhodnocení ELISA (metabolické aktivity buněk)

5.5 Model poškození povrchu oka

Myši byly uspány intramuskulární injekcí 0,35 ml směsi Calypsolu a Rometaru v poměru 1:1 pomocí injekční stříkačky Omnifix U-100 insulin (B. Braun Melsungen AG, Německo) a jehly 25G1 Precisionglide Needle (Beckton Dickinson and Co., Rutherford, NJ). Po uspání byl pinzetou na povrch oka přiložen filtrační papír o průměru cca 0,2 cm napuštěný 8 µl 0,25M NaOH a ponechán zde po dobu 25 vteřin, k dosažení požadovaného

poškození rohovky. Následně byl filtrační papír odstraněn a oko opláchnuto nadbytečným množstvím PBS. Po poškození následovaly další kroky dle požadovaného pokusu.

5.6 Izolace a kultivace LSC

Limbální tkáň byla odebrána pomocí očních nůžek E-3387 (KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen Německo) z obou očí každého zvířete pod operačním mikroskopem do RPMI média. V laminárním boxu bylo toto medium slito a limby byly rozstříhány a centrifugovány v 8 ml PBS po dobu 8 minut při 170g.

Po centrifugaci bylo k peletě limbální tkáně přidáno 400 μ l 0,5% roztoku trypsinu vytemperovaného na 37 °C. Zkumavka s limbální tkání byla inkubována v 37 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci byl objem trypsinu s uvolněnými buňkami odsát Pasteurovou pipetou a přenesen do kyvety s RPMI médiem chlazeným ledovou tříští. Ke zbytku limbů bylo opět přidáno 400 μ l trypsinu a tento postup byl opakován 10x.

Po posledním odběru bylo medium s přenesenými uvolněnými buňkami centrifugováno (8 minut, 170g). Peleta byla resuspendována v objemu 2 ml RPMI média a přenesena do Petriho misky o průměru 3 cm (TPP, Techno plastic products AG, Trasadingen, Švýcarsko). Buňky byly kultivovány v inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C). Po dvou dnech byly buňky dvakrát promyty čerstvým RPMI médiem (37 °C) pro odstranění neadhernentních buněk. Po nárůstu LSC po celém povrchu Petriho misky (5 - 7 dnů) byly tyto buňky uvolněny trypsinem a přeneseny do 25 cm² kultivační lahve (TPP) spolu s 5 - 6 ml čerstvého RPMI.

LSC byly kultivovány po dobu 2 - 3 týdnů a každých 3 - 5 dnů byly pasážovány pomocí trypsinu (0,5% roztok). Buňky s trypsinem byly inkubovány při 37 °C po dobu 5 - 10 minut. Účinek trypsinu byl zastaven nadbytkem RPMI média. Buňky byly resuspendovány pomocí pipety a polovina objemu byla ponechána v kultivační lahvi, do které bylo přidáno čerstvé RPMI medium do požadovaného objemu (5 - 6 ml).

5.7 Izolace a kultivace MSC

MSC byly získávány z tukové tkáně nebo kostní dřeni.

Tuková tkáň byla odebírána z abdominální tříselné tukové kapsy. Tuková tkáň byla rozstříhána a bylo k ní přidáno 900 μ l HBSS a 100 μ l 1% roztoku kolegenázy I (Sigma-Aldrich) pro uvolnění buněk. Směs s kolagenázou byla inkubována v inkubátoru při 37 °C za občasného míchání. Po 40 minutách byla tuková tkáň resuspendována pomocí

pipety a inkubována dalších 20 minut. K uvolněným buňkám bylo přidáno 8 ml DMEM. Suspenze buněk byla přenesena do zkumavky a centrifugována (8 minut, 170g). Vrchní část média s uvolněným tukem byla odstraněna a peleta se zbytkem média byla přenesena do čisté zkumavky s 8 ml čerstvého DMEM média a znovu centrifugována (8 minut, 170g). Po centrifugaci byla peleta resuspendována v 5 – 6 ml DMEM. Suspenze získaných buněk (cca 25×10^6 buněk) byla přenesena do 25 cm² kultivační lahve (TPP). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C.

MSC z kostní dřevě byly získávány výplachem holenních a stehenních kostí pomocí DMEM s 5 % FCS. Kostní dřevě byla zhomogenizována ve skleněném homogenizátoru, celý objem byl přenesen do zkumavky a centrifugován (8 minut, 170g). Peleta buněk byla resuspendována v 5 – 6 ml DMEM (cca 25×10^6) a přenesena do 25 cm² kultivační lahve (TPP). Buňky byly kultivovány v CO₂ inkubátoru při 37 °C.

MSC z kostní dřevě nebo tukové tkáně byly po 48 hodinách dvakrát opláchnuty nahřátým (37 °C) DMEM pro odstranění neadherentních buněk. Adherentní buňky byly dále kultivovány po dobu 15 – 20 dnů, během kterých byly provedeny 3 – 4 pasáže. Po uplynutí této doby byly SC použity k experimentům.

5.8 Kultivace SC na nanovlákněném nosiči a transplantace SC na poškozený povrch oka

Nanovlákněný nosič byl připraven firmou Elmarco s.r.o. (Liberec, ČR). K jeho výrobě byl použit polymer kyseliny mléčné. Nanovlákněný nosič byl nastříhán na čtverce o velikosti 1,5 x 1,5 cm a upevněn do kroužků CellCrown 24 (Scaffdex, Tampere, Finsko), které byly spolu s nosičem z obou stran sterilizovány pomocí UV záření (30 minut). Takto fixované nosiče byly namočené do tkáňové vody po dobu 24 hodin, dále promyty RPMI médiem a umístěny do 24jamkové kultivační destičky (TPP). Na nanovlákněný nosič bylo nasazeno 3×10^5 buněk v celkovém objemu 700 µl pro každou použitou jamku. SC na nosičích byly inkubovány po dobu 24 hodin.

Na poškozený povrch oka byl nanovlákněný nosič (bez buněk nebo s SC) o průměru cca 0,5 cm fixován pomocí čtyř protilehlých stehů k limbu pomocí jehly a nitě (11/0 NYLON, Resorba Medical GmbH, Nurnberg, Německo). Transplantace byly prováděny pod operačním mikroskopem. Oční víčko takto ošetřeného oka bylo sešito dvěma stehy pomocí jehly a nitě (7/0 Resolon, Resorba). Zašitá oční štěrba byla ošetřena Ophthalmo-Framykoinem (Zentiva, Praha, ČR). Po třech dnech bylo oko rozešito a nosič

odstraněn. Po dalších čtyřech dnech byla zvířata usmrcena a rohovky odebrány pro analýzu genové exprese.

Jako pozitivní kontroly pro porovnání obnovy poškozeného povrchu oka byly použity rohovky z myši, kterým byla po poškození pouze sešita víčka. Jako negativní kontroly sloužily rohovky z nepoškozených očí.

5.9 Odběr rohovky

Rohovky byly odebírány ve stanovených časových intervalech (7 a 14 dnů) pod operačním mikroskopem a přeneseny do 500 μ l TRI reagent (MRC, Molecular Research Center, Cincinnati, ME) ve kterém byly zamrazeny v -80 °C nebo byly použity pro izolaci RNA.

5.10 Izolace mRNA

Do 500 μ l TRI reagent s rohovkou bylo přidáno 2,5 μ l Polyacyl carrier (MRC) pro lepší vizualizaci pelety. Rohovky byly rozmělněny plastovým homogenizátorem a k suspenzi bylo přidáno 100 μ l chloroformu (Penta, Praha, ČR), obsah zkumavky byl silně protřepán, dokud se obě složky nespojily. Poté se nechala mikrozkušavka 10 minut stát, aby došlo k oddělení fází a dále byly vzorky centrifugovány (4 °C, 15 minut, 12000g). Vodní (horní) fáze byla přenesena do nové zkumavky. K odebrané vodní fázi bylo přidáno 250 μ l izopropanolu (Penta). Pomalým přetáčením zkumavek se obě složky promíchaly. Mikrozkušavky se nechaly 10 minut stát a dále byly centrifugovány (4 °C, 10 minut, 12000g). Vzniklá peleta byla centrifugována v 500 μ l 75% Ethanolu (Penta) v mikrocentrifuze po dobu cca 5 minut pro omytí. Ethanol byl odsát, peleta se nechala při laboratorní teplotě vysušit a dále se resuspendovala v 10 μ l PCR vody (Top-Bio, Praha, ČR). Vzorek se ihned zamrazil v -80 °C nebo byl použit k další analýze.

5.11 Reverzní transkripce

Koncentrace mRNA byla změřena pomocí spektrofotometru. Z naměřené koncentrace byl vypočten potřebný objem vzorku, který byl odebrán z celkového objemu vyizolované RNA. Tento objem vzorku byl doplněn do 8 μ l PCR vodou. Do mikrozkušavky se vzorkem byly přidány 2 μ l směsi připravené z reakčního pufru DNázy I (DNase I reaction buffer, Promega, Madison, WI) a DNázy I (1U/ μ l, Promega) v poměru 1:1. Konečný objem byl tedy

10 µl. Vzorky byly vloženy do cycleru a zahřáty na 37 °C po dobu 30 minut. Ihned po dokončení programu bylo do vzorků přidáno po 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (Promega) pro inaktivaci DNázy I, která proběhla v cycleru po dobu 10 minut při 65 °C. Po skončení programu byly vzorky ihned schlazeny na ledu. Do zkumavek bylo přidáno po 14 µl směsi připravené smícháním 5 µl M-MLV Reaction Buffer (Promega), 5 µl dNTP (Promega), 1 µl Random primerů (100 ng) (Promega), 0,5 µl inhibitoru ribonukleázy (20 U) (TaKaRa, Bio Inc., Shiga, Japonsko), 0,5 µl reverzní transkriptázy M-MLV (TaKaRa) a 2 µl PCR vody (Top-Bio). Přepis byl proveden v cycleru při 37 °C po dobu 60 minut.

5.12 Real-time PCR

Získaná cDNA z reverzní transkripce byla zpracována metodou real-time PCR. Jako referenční gen byl použit GAPDH (glyceraldehyd dehydrogenáza).

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

Primer	Sekvence
GAPDH s	5'-AGAACATCATCCCTGCATCC-3'
GAPDH a	5'-ACATTGGGGTAGGAACAC-3'
Adn s	5'-CTGGGAGCGGCTGTATGT-3'
Adn a	5'-CACGGAAGCCATGTAGGG-3'
Aldh1a1 s	5'-GCCATCGTGTCATCTGC-3'
Aldh1a1 a	5'-CATCTTGAATCCACCGAAGG-3'
Bglap s	5'-AGACTCCGGCGCTACCTT-3'
Bglap a	5'-TGCCAGAATCAGTCACTTTCAC-3'
COX-1 s	5'-ACCTACGTCTACGCCAAAGG-3'
COX-1 a	5'-GTGGTTTCCAACCAAGATCA-3'
COX-2 s	5'-AGCCCACCCCAAACACAGT-3'
COX-2 a	5'-AAATATGATCTGGATGTCAGCACATATT-3'
HGF s	5'-CACCCCTTGGGAGTATTGTG-3'
HGF a	5'-GGGACATCAGTCTCATTACAG-3'
IDO s	5'-GGGCTTTGCTCTACCACATC-3'
IDO a	5'-AAGGACCCAGGGGCTGTAT-3'
IFN-γ s	5'-ATCTGGAGGAACTGGCAAAA-3'
IFN-γ a	5'-TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG-3'
IL-2 s	5'-GCTGTTGATGGACCTACAGGA-3'
IL-2 a	5'-TTCAATTCTGTGGCCTGCTT-3'
IL-6 s	5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3'
IL-6 a	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
iNOS s	5'-CTTTGCCACGGACGAGAC-3'
iNOS a	5'-TCATTGTA CTCTGAGGGCTGAC-3'

K14 s	5'-ATCGAGGACCTGAAGAGCAA-3'
K14 a	5'-TCGATCTGCAGGAGGACATT-3'
Ker s	5'-TCCCCATCAACTTATTTTAGC-3'
Ker a	5'-AGTTTGGGGTTGCCATTACA-3'
Lum s	5'-GGATGGCAATCCTCTCACTC-3'
Lum a	5'-TCATTTGCTACACGTAGACTCAT-3'
Pparg2 s	5'-GAAAGACAACGGACAAATCACC-3'
Pparg2 a	5'-GGGGGTGATATGTTTGAAGTTG-3'
Spp1 s	5'-GGAGGAAACCAGCCAAGG-3'
Spp1 a	5'-TGCCAGAATCAGTCACTTTCAC-3'
TGF- β s	5'-TGGAGCAACATGTGGAAGTCA-3'
TGF- β a	5'-CAGCAGCCGGTTACCAAG-3'
VEGF s	5'-AAAAACGAAAGCGCAAGAAA-3'
VEGF a	5'-TTTCTCCGCTCTGAACAAGG-3'
s - sense, a – antisense	

Vzorky cDNA byly naředěny 50 μ l PCR vody. Do 96jamkové destičky pro PCR (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0,1 mL, Life Technologies, Carlsbad, CA) bylo do určených jamek vpraveno 7 μ l mixu s primery skládajícího se z 1 μ l PCR vody, 1 μ l primeru (1:1 sense a antisense primer, Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR) (viz tabulka 1) a 5 μ l SYBR green (Power SYBR Green PCR master MIX, Applied Biosystems, Warrington, UK). Vzorky byly do jamek nanášeny v objemu 3 μ l. Analýza byla provedena na přístroji StepOne Plus RT-PCR system (Applied Biosystems). Specifita primerů byla kontrolována pomocí křivek tání a k vypočítání exprese genů byl použit relativní model kvantifikace v porovnání s referenčním genem GAPDH. Nastavení PCR reakce pro 10 μ l reakci bylo:

1. 3 minuty při 95 °C – aktivace Hot start polymerázy
2. 40 cyklů – 10 vteřin při 95 °C denaturace cDNA, 20 vteřin při 65 °C nasedání primerů (hybridizace), 20 vteřin při 72 °C elongace a nakonec 5 vteřin při 82 °C detekce fluorescence
3. Analýza křivek tání – zvyšování teploty o 0,5 °C každých 10 vteřin od 55 °C do 95 °C

5.13 Stimulace SC pomocí LPS

MSC a LSC byly přeneseny v počtu 3×10^5 na jamku 12jamkové kultivační destičky (TPP). Každý typ buněk byl nasazen do dvou jamek. Celkový objem DMEM na jamku byl 2 ml. První sloužila jako kontrola a do druhé bylo přidáno LPS o koncentraci 5 μ g/ml. Buňky byly kultivovány v inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) po dobu 72 hodin. Po kultivaci bylo médium

odsáto, do jamek byl přidán TRI reagent o objemu 500 μ l. Po lýze buněk byl obsah přenesen do mikrozkušavek a zamražen v -80 °C.

5.14 Řezy rohovky a barvení preparátů

Oči myši byly odebrány pomocí pinzety a chirurgických nůžek a přeneseny do mikrozkušavky s 1 ml 4% formaldehydu, kde se ponechaly po dobu 50 minut. Oči byly 3x promyty pomocí PBS vloženy do 7,5% sacharózy, která byla po 60 minutách nahrazena 15% sacharózou, ve které vzorky zůstaly až do zhotovení řezů.

Oči byly zality do zamrazovacího média Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura, Tokyo, Japonsko), zmrazeny na -21 °C a nařezány na zmrazovacím mikrotomu na řezy o tloušťce 6 μ m.

Řezy byly barveny hematoxylinem (hematoxylin Harrisův, Sigma-Aldrich) a eosinem (0,2 g, 200 ml H₂O, Sigma-Aldrich). V postupu byl použit roztok kyselého alkoholu (200 ml 80% ethanolu, 4 ml HCl, Lachema, Brno, ČR), roztok NaHCO₃ (200 ml H₂O, 0,4 ml NaHCO₃, Sigma-Aldrich). Samotné barvení probíhalo podle následujícího postupu:

- 1) Hematoxylin (3 minuty)
- 2) Oplach vodou
- 3) Kyselý alkohol – krátké ponoření
- 4) Oplach vodou
- 5) NaHCO₃ – krátké ponoření
- 6) Eosin (3 minuty)
- 7) Oplach destilovanou vodou
- 8) Sušení na vzduchu
- 9) Zalití glycerinem (Lachema) a překrytí krycím sklíčkem

5.15 Průtoková cytometrie

Při měření byly použity monoklonální protilátky (mAb, monoclonal antibody) konjugované s fluorochromy allofykocyanin (APC, allophycocyanine), fluorescein isothiokyanát (FITC, fluorescein isothiocyanate) a fykoerytrin (PE, phycoerythrin) (viz tabulka 2). Protilátky byly naředěny v PBS. Pro značení mrtvých buněk byl použit Hoechst 33258 (Sigma) ředěný 1:40000 v PBS.

Při detekci povrchových znaků byly vzorky obarveny podle následujícího postupu:

- 1) Centrifugace (3 minuty, 170g).
- 2) Rozvolnění pelety buněk, přidání 10 µl protilátky proti povrchovým znakům.
- 3) Inkubace ve tmě (4 °C, 30 minut).
- 4) 2 x promytí 200 µl PBS, centrifugace (3 minuty, 170g).
- 5) Naředění do 200 µl PBS.
- 6) 10 minut před měřením přidání 20 µl Hoechst 33258.

Tabulka 2: Seznam použitých protilátek

Znak	Fluorochrom	Koncentrace (mg/ml)	Ředění	Výrobce	Značení
CD11b	APC	0,2	1:50	BioLegend	povrchové
CD31	PE	0,5	1:50	BD PharMingen	povrchové
CD44	APC	0,5	1:55	BD PharMingen	povrchové
CD105	PE	0,2	1:50	eBioscience	povrchové

5.16 Test metabolické aktivity SC

WST-1 proliferační test byl použit k ověření schopnosti růstu MSC a LSC v daných koncentracích (3000, 10000 a 30000 buněk/jamku 24jamkové destičky). Test je založen na schopnosti živých buněk štěpit tetrazoliové soli pomocí mitochondriálních dehydrogenáz na ve vodě rozpustný formazan, který je měřen pomocí spektrofotometru. Buňky byly kultivovány ve 24jamkové destičce (TPP) po dobu 24 a 48 hodin (37 °C, 5 % CO₂) v RPMI médiu s 10 % séra. Do jamek s kultivovanými buňkami bylo po uplynuté době přidáno 10 µl tetrazoliové soli-1 (water soluble tatrazolium-1, WST-1, Roche, Penzberg, Německo) na 100 µl média. Destička s buňkami a WST-1 byla 4 hodiny inkubována pro vytvoření formazanu. Z každé jamky bylo přeneseno 100 µl média s formazanem do 96jamkové destičky (TPP) a pomocí ELISA readeru byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Tento postup byl proveden v čase 0, 24 a 48 hodin.

5.17 Diferenciace SC

SC byly kultivovány ve 24jamkové destičce (TPP) v přítomnosti adipogenního nebo osteogenního činidla po dobu 2 - 3 týdnů. Adipogenní činidlo obsahovalo 10 ml DMEM,

100 μ l indometacinu (0,1mM), 10 μ l inzulinu (0,5 μ g/ml), 10 μ l 3-izobutyl-1-metylantynu (0,5mM) a 1 μ l dexametazonu (0,1 μ M). Osteogenní činidlo pak 10 ml DMEM, 1000 μ l glycerol-2-fosfátu (10mM), 10 μ l kyseliny L-askorbové (0,1mM) a 1 μ l dexametazonu (0,1 μ M) (složky adipogenního a osteogenního činidla byly od firmy Sigma-Aldrich). Pro každý pokus byly použity dvě sady buněk, jedna pro přípravu mikroskopického preparátu a druhá pro analýzu pomocí real-time PCR. Pro potřeby real-time PCR byly diferencované buňky přeneseny do 500 μ l TRI reagent (dále viz předešlé postupy). Pomocí real-time PCR byla analyzována exprese genů pro adiposin (Adn), pro gama receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory 2 (Pparg2), osteocalcin (Bone gamma carboxyglutamate protein, Bglap) a osteopontin (Secreted Phosphoprotein 1, Spp1)

Diferencované SC byly fixovány formaldehydem po dobu 1 hodiny a následně důkladně opláchnuty destilovanou vodou. Tukové vakuoly byly barveny pomocí naředěného roztoku Oil Red (3,5 mg/ml, 200 ml izopropanolu, Sigma-Aldrich) v poměru 6:4 s destilovanou vodou. Depozita vápníku u SC diferencovaných na osteocyty byla barvena Alizarin Red S (20 mg/ml, 200 ml destilované vody, Sigma-Aldrich).

5.18 Statistická analýza

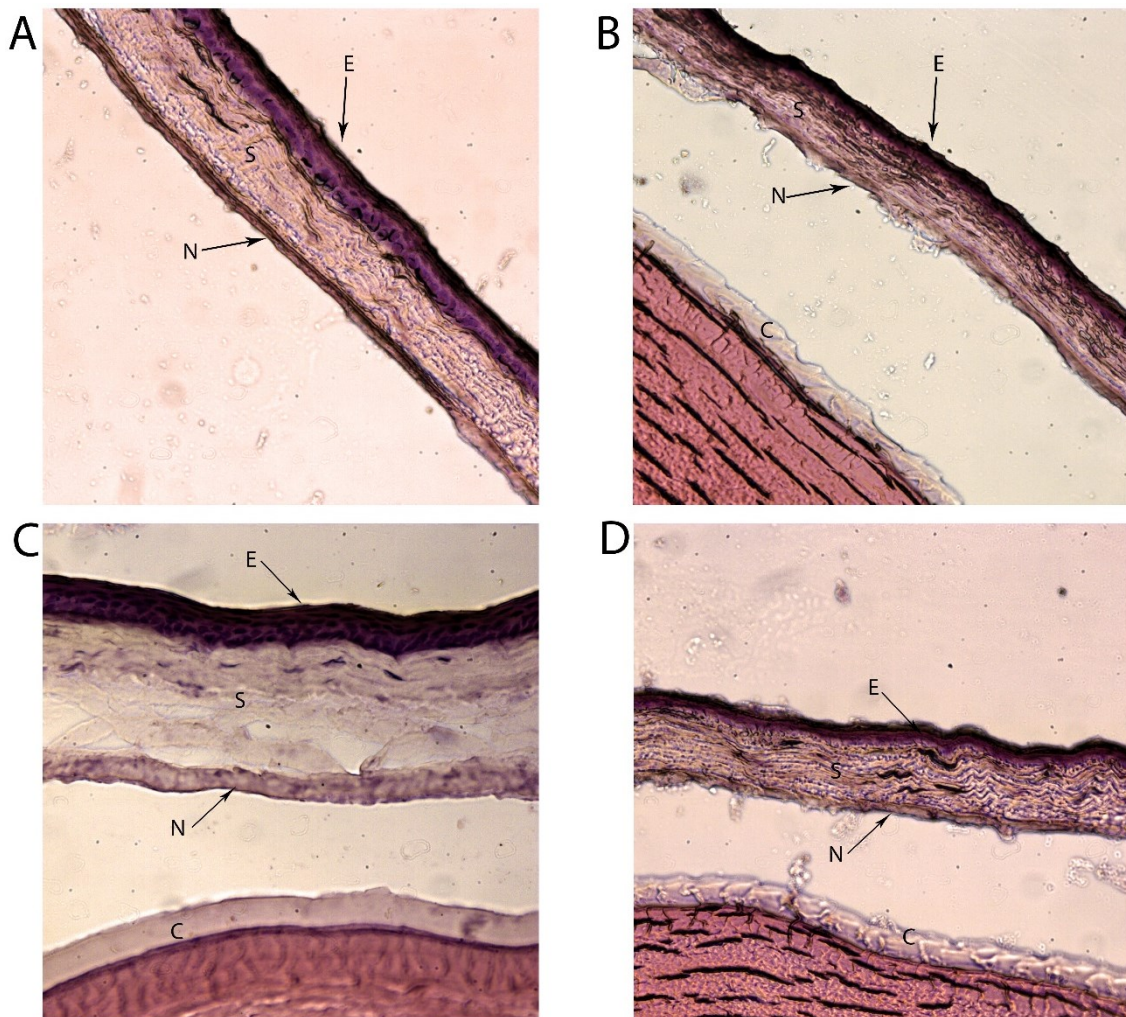
K prezentaci výsledků byl použit aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou (standart deviation, SD). Statistická signifikace byla ověřena Studentovým t-testem. Hodnoty *P<0,05, **P<0,01 a ***P<0,001 byly považovány za signifikantní.

6. Výsledky

6.1 Model poškození povrchu oka

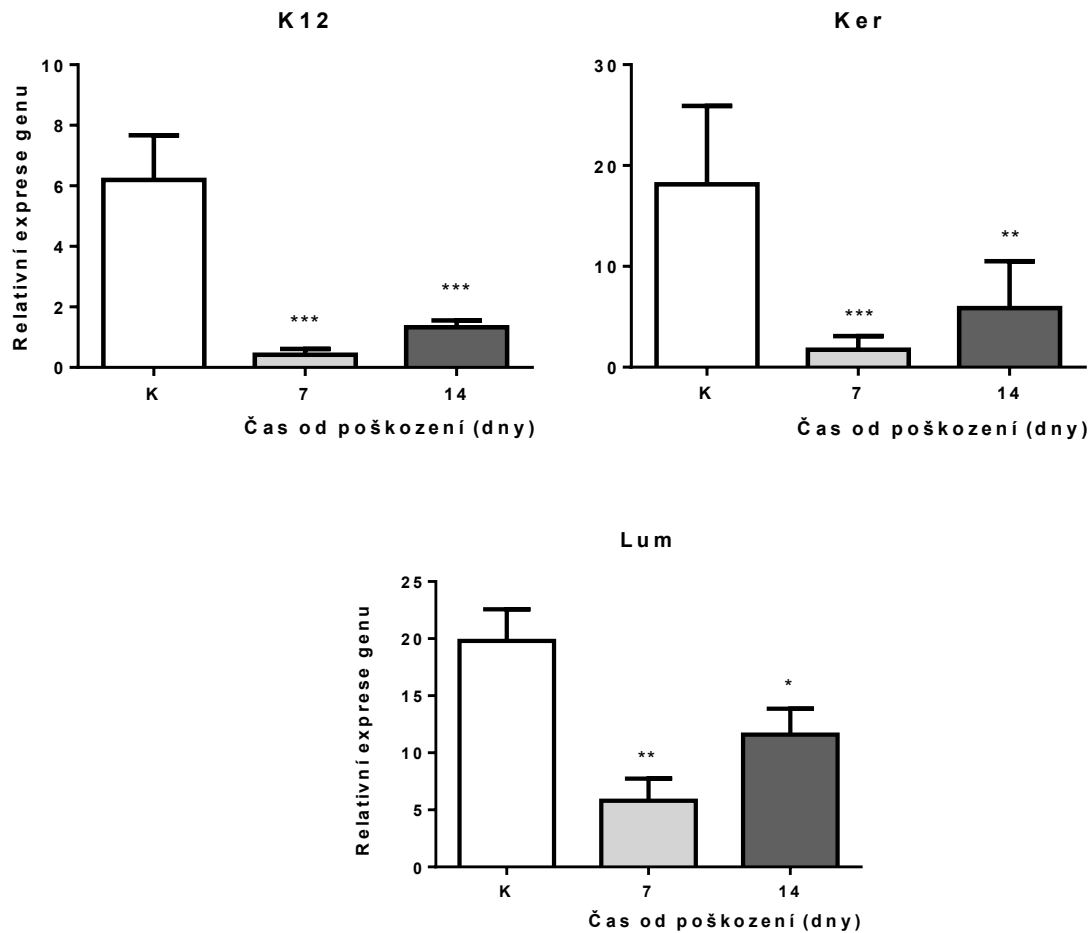
6.1.1 Poškození rohovky

K poškození rohovky byl použit filtrační papír napuštěný 0,25M NaOH a přiložený na myší rohovku po dobu 25 vteřin. Rozsah poškození byl ověřen pomocí mikroskopických řezů rohovky barvených hematoxylinem-eosinem (Obr. 1) a analýzou exprese genů pro znak epitelu myší rohovky K12 a další znaky rohovky jako Keratocan (Ker) a Lumican (Lum) nacházejících se převážně v rohovkovém stromatu. Vyhodnocení exprese znaků pomocí real-time PCR a vizuální kontrola pod mikroskopem byly provedeny vždy 7. (Obr. 1A a 1B) a 14. (Obr. 1C a 1D) den po poškození rohovky. Zjistili jsme, že po poškození je rohovka viditelně tenčí, epitel dostatečně poškozený i po 7 dnech a ani po 14 dnech nedochází k významné regeneraci epitelu rohovky. Vyhodnocením výsledků z real-time PCR jsme potvrdili vhodnost tohoto modelu. Exprese genu pro K12 je po poškození výrazně snížena a po 14 dnech lze pozorovat jen mírnou regeneraci rohovkového epitelu (Obr. 2). Geny pro Ker a Lum jsou po 14 dnech exprimovány ve vyšší míře než K12 (Obr. 2), což ukazuje, že poškození nezasáhlo větší měrou i do hlubších vrstev rohovky. Tento model tak umožňuje po aplikaci SC pozorovat případné změny v expresi genu pro K12 a odvodit z nich terapeutický účinek transplantace SC na regeneraci rohovkového epitelu.



Obrázek 1: Řezy rohovky po poškození 0,25M NaOH.

Rohovy byly poškozeny 0,25M NaOH po dobu 25 vteřin. Kontrolní řez okraje rohovky bez poškození (A) s neporušeným rohovkovým epitelem (E), stromatem (S) a endotelem (N) v porovnání s řezem krajní části rohovky 7 dní po poškození (B). Kontrolní řez centrální rohovky (C) a porovnání s centrální rohovkou 14 dní po poškození (D). V dolní části obrázků B, C a D je viditelná čočka (c). Použité zvětšení je 40x.

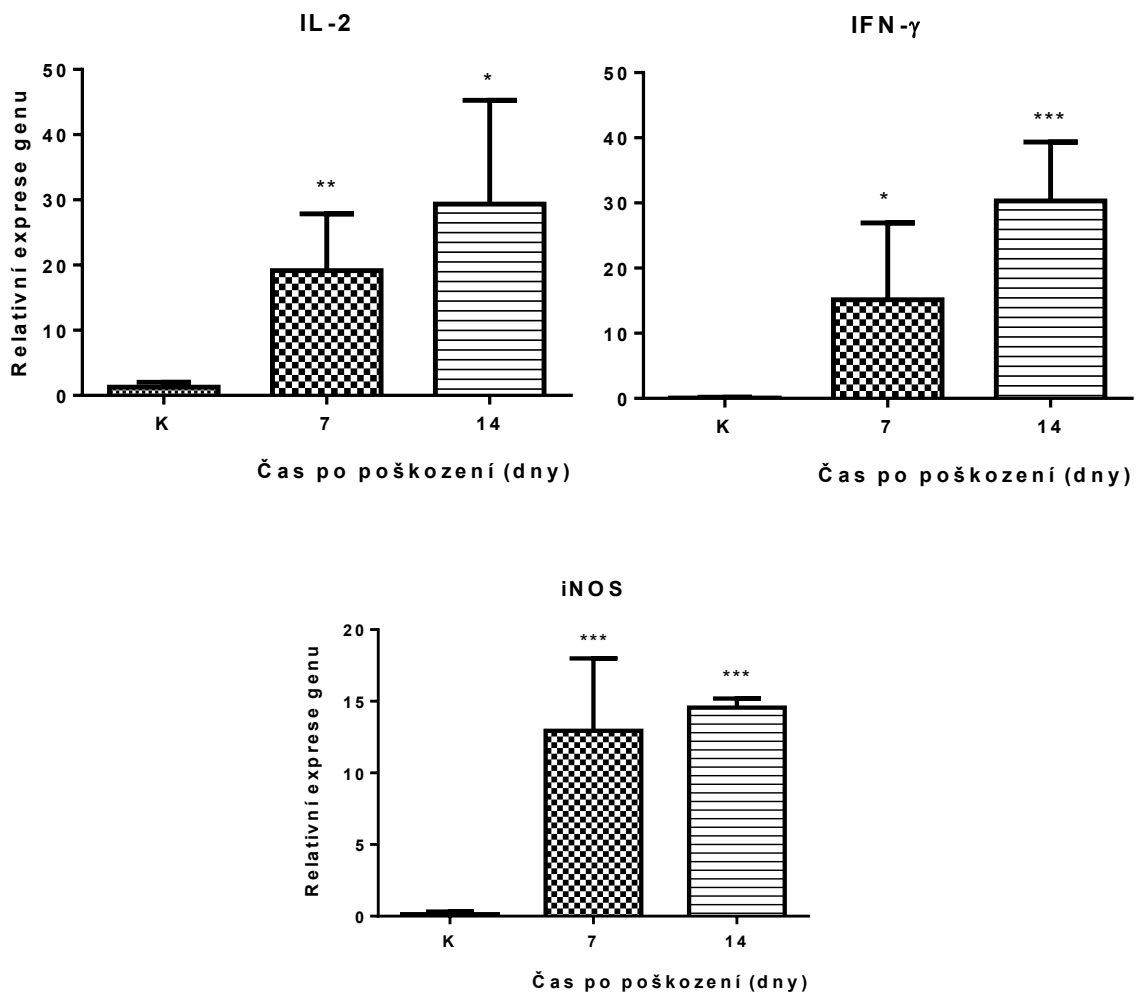


Obrázek 2: **Expresse znaků rohovky po poškození 0,25M NaOH**

Znak rohovkového epitelu cytokeratin K12 (K12) a znaky rohovky Keratocan (Ker) a Lumican (Lum) nacházející se převážně v rohovkovém stromatu. Expresse těchto znaků oproti nepoškozené kontrolní rohovce (K) 7. a 14. den po poškození. Data představují průměry společně s +SD z pěti nezávislých pokusů (**P<0,001, **P<0,01 a *P<0,05 proti K)

6.1.2 Lokální zánětlivá reakce po poškození rohovky

Jedním z cílů práce je analýza vlivu transplantovaných SC na lokální expresi genů pro cytokiny a další prozánětlivé molekuly v rohovce po poškození. Po poškození povrchu oka jsme pomocí real-time PCR provedli analýzu exprese genů pro IL-2, IFN- γ a iNOS, tedy cytokinů a enzymu typických pro zánět. Analýza byla provedena 7. a 14. den po poškození. Po poškození rohovky dochází k lokální zánětlivé reakci, kterou jsme detekovali i po 14 dnech po poškození (Obr. 3). Výsledky korelují s pomalou regenerací povrchu oka po poškození. V experimentech s transplantacemi SC na poškozený povrch oka jsme sledovali expresi genů pro více molekul spojených se zánětem.



Obrázek 3: Exprese genů pro prozánětlivé molekuly v poškozené rohovce

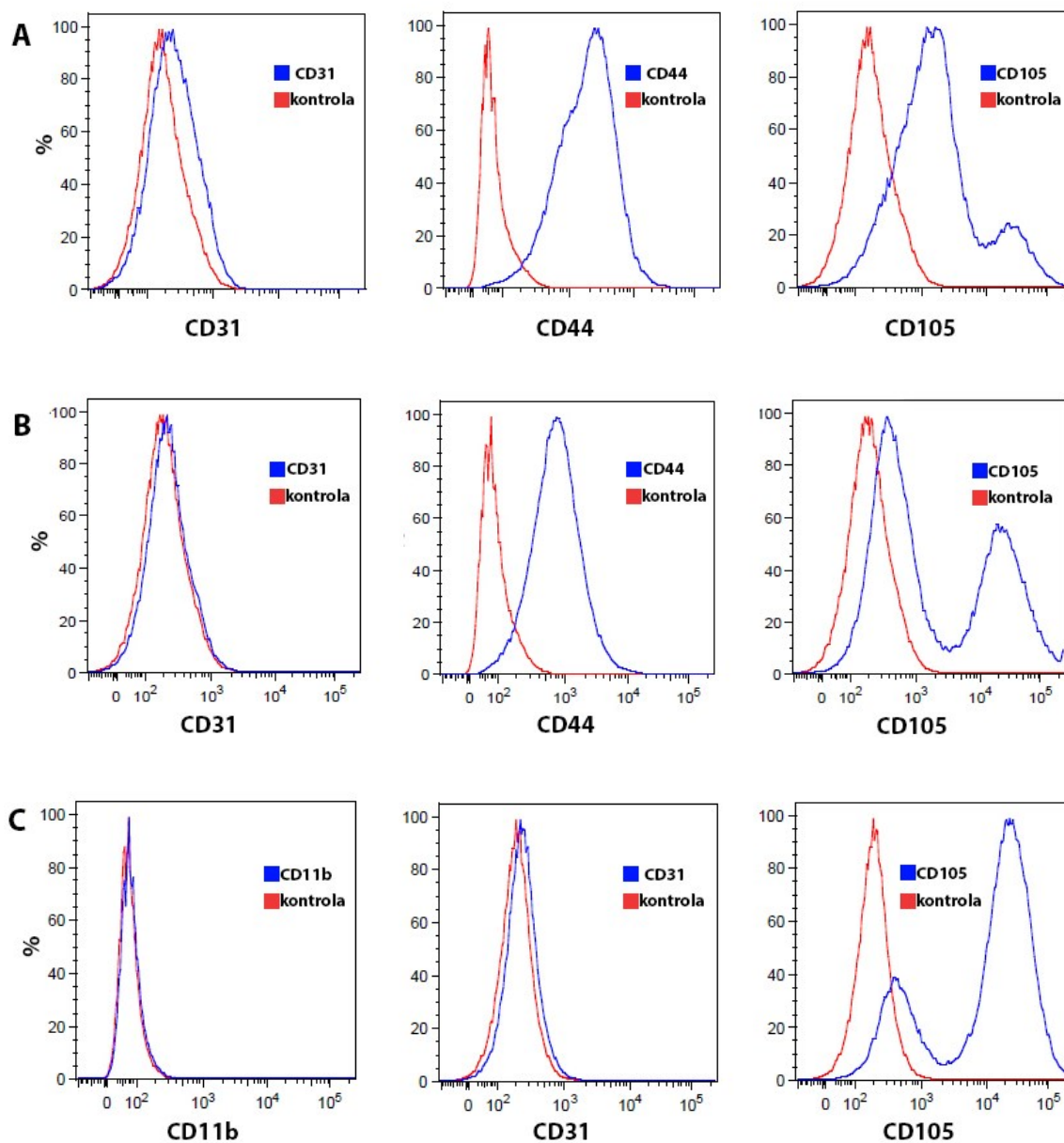
Expresa prozánětlivých cytokinů interleukinu-2 (IL-2) a interferonu- γ (IFN- γ) společně s inducibilní syntázou oxidu dusnatého (iNOS) 7 a 14 dní po poškození rohovky 0,25M NaOH. Data představují průměry a +SD ze čtyř nezávislých pokusů (*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ proti kontrole - zdravé rohovce (K)).

6.2 Charakterizace použitých SC

6.2.1 Fenotypová charakterizace SC

V pokusech byly použity AD-MSC, BM-MSC a LSC. MSC jsou definovány kromě schopnosti diferenciaci a adhezí k plastu nepřítomností znaků buněk hematopoetické linie jako CD45, CD34, CD14 nebo CD11b, CD79 nebo CD19 a expresí CD44, CD73, CD90 a CD105.

Stanovení povrchových znaků SC bylo provedeno analýzou na průtokovém cytometru. Analyzovali jsme expresi pro povrchové znaky CD11b, CD31, CD44 a CD105. Bylo pozorováno, že AD-MSC ani BM-MSC neexprimují CD31 a exprimují CD44 a CD105 (obr. 4A a 4B). LSC neexprimují CD11b a CD31 a exprimují CD105 (Obr. 4C).

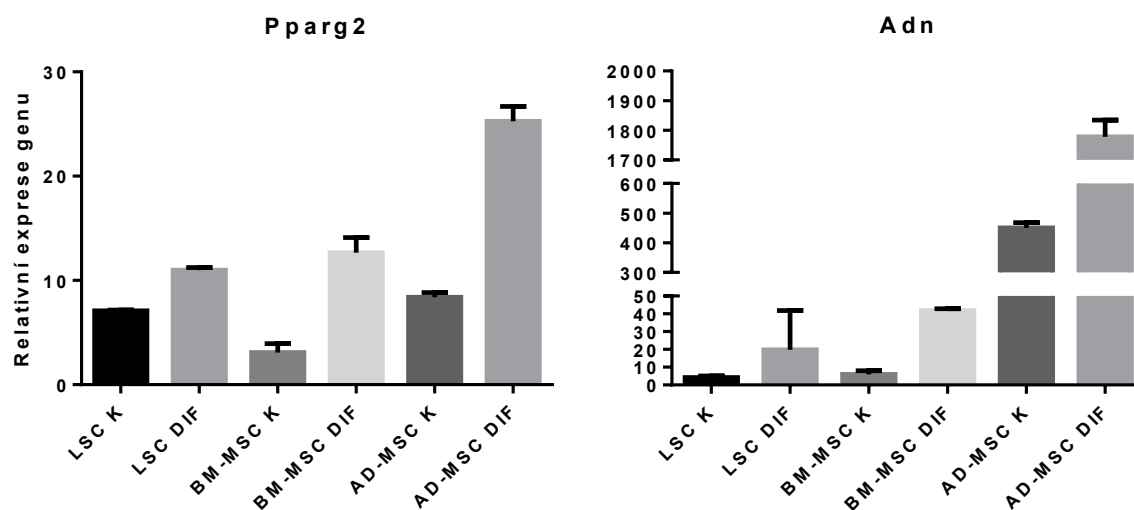
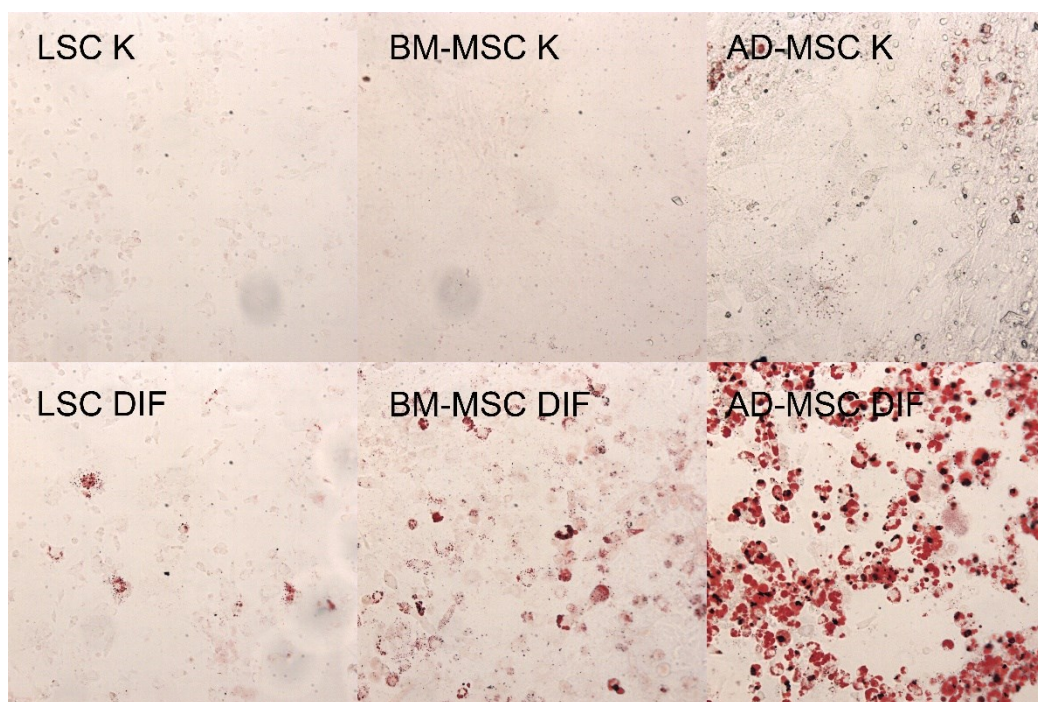


Obrázek 4: Stanovení povrchových znaků BM-MSC, AD-MSC a LSC

Pomocí průtokové cytometrie byla u BM-MSC (A) a AD-MSC (B) zjištěna nepřítomnost znaku CD31 a přítomnost CD44 a CD105. U LSC (C) byla zjištěna nepřítomnost CD11b a CD31 a přítomnost CD105.

6.2.2 Diferenciace SC

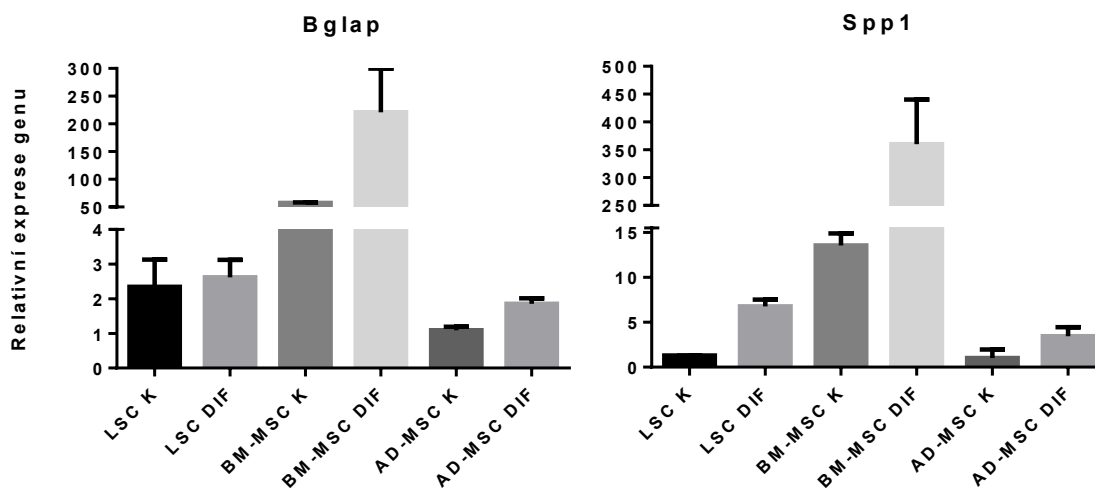
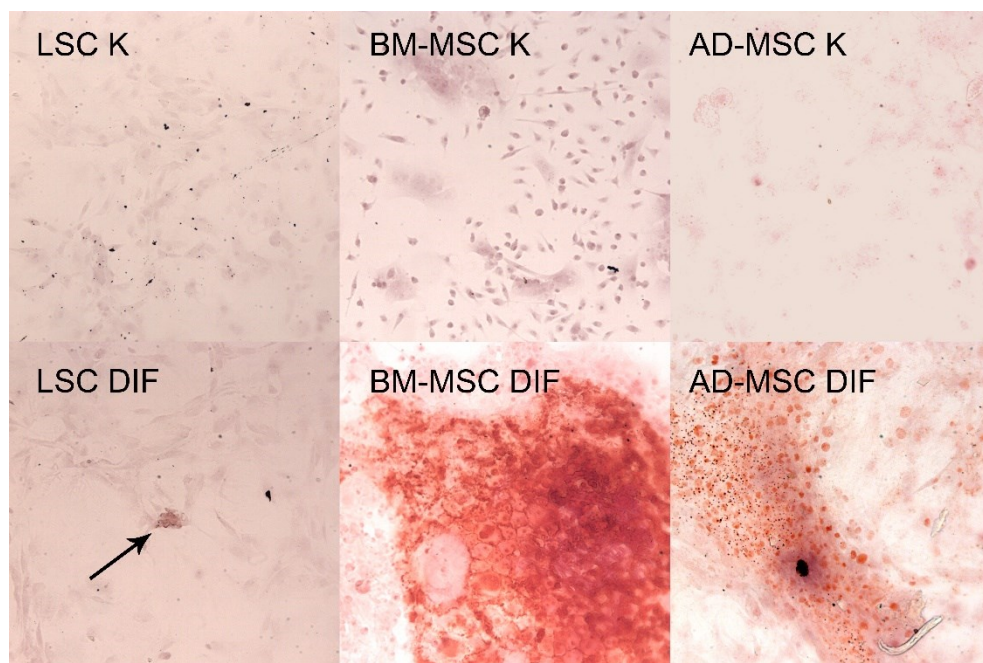
Po stimulaci diferenciálními činidly jsou BM-MSK, AD-MSK a LSC schopny diferencovat v buňky tukové a kostní tkáně. Diferenciace v buňky tukové tkáně je zobrazena mikroskopickými snímky (Obr. 5) a real-time PCR analýzou genů pro Pparg2 a adiposin (Obr. 5). Diferenciace v buňky kostní tkáně je znázorněna opět mikroskopickými snímky (Obr. 6) a pomocí real-time PCR analýzou genů Bglap a Spp1 (Obr. 6).



Obrázek 5: Adipogenní diferenciaci

Expresí genů pro gama receptor aktivovaný peroxisomovými proliferátory 2 (Pparg2) a adipsin (Adn) byla analyzována pomocí real-time PCR u kontrol (K) a diferencovaných (DIF) LSC, BM-MSC, AD-MSC. Data představují průměry s +SD ze dvou nezávislých pokusů. Mikroskopické snímky nediferencovaných (K) a diferencovaných (DIF) LSC, BM-MSC a AD-MSC. Zvětšeno 40x.

BM-MSC mají nejvyšší schopnost diferenciaci v buňky kostní tkáně, AD-MSC naopak v buňky tukové tkáně. LSC vykazují během diferenciaci v kostní tkáň vyšší expresi osteopontinu než AD-MSC. Na mikroskopických snímcích ale AD-MSC diferencují v buňky kostní tkáně lépe než LSC.

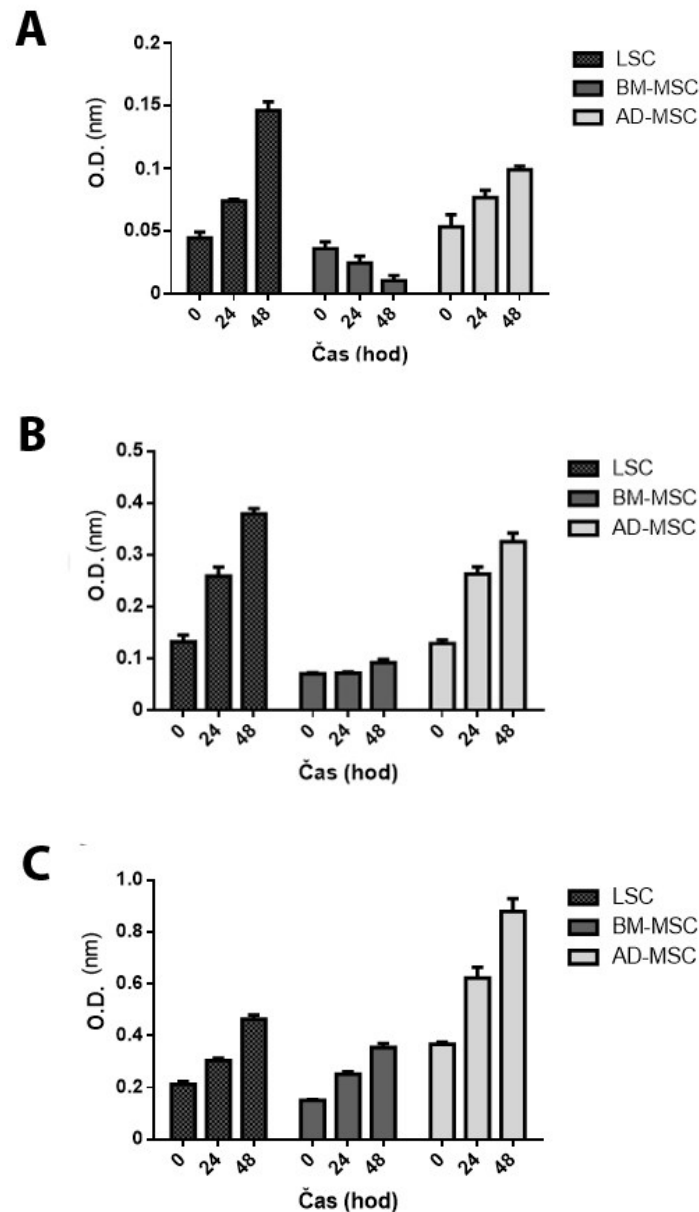


Obrázek 6: Osteogenní diferenciaci

Expres genů pro osteopontin (Spp1) a osteocalcin (Bglap) byla analyzována pomocí real-time PCR u kontrol – nediferencovaných (K) a diferencovaných (DIF) LSC, BM-MSC a AD-MSC. Data představují průměry s +SD ze dvou nezávislých pokusů. Mikroskopické snímky nediferencovaných (K) a diferencovaných (DIF) LSC, BM-MSC a AD-MSC. Zvětšeno 40x. Šipka u LSC DIF ukazuje diferencované buňky.

6.2.3 Stanovení metabolické aktivity SC pomocí testu WST-1

Pomocí WST-1 proliferačního testu jsme porovnávali růstové vlastnosti SC buněk ve třech koncentracích (3000, 10000 a 30000 buněk na jamku 24jamkové destičky). Při koncentraci 3000 buněk na jamku rostou LSC i AD-MSC, v porovnání s vyššími koncentracemi, ve značně menší míře (Obr. 7A). U BM-MSC k růstu při této koncentraci nedochází a naopak je pozorován jejich úbytek. Při zvýšení koncentrace na 10000 buněk na jamku u BM-MSC dochází k velmi malému nárůstu až po 48 hodinách (Obr. 7B). Teprve při koncentraci 30000 buněk na jamku dochází k růstu u všech tří typů použitých SC (Obr. 7C). Výsledky ukazují na nutnost použití větší koncentrace buněk pro nárůst SC během kultivace v médiu a během kultivace na nanovlákněném nosiči. Největší schopnost růstu v kultuře mají tukové MSC a LSC.



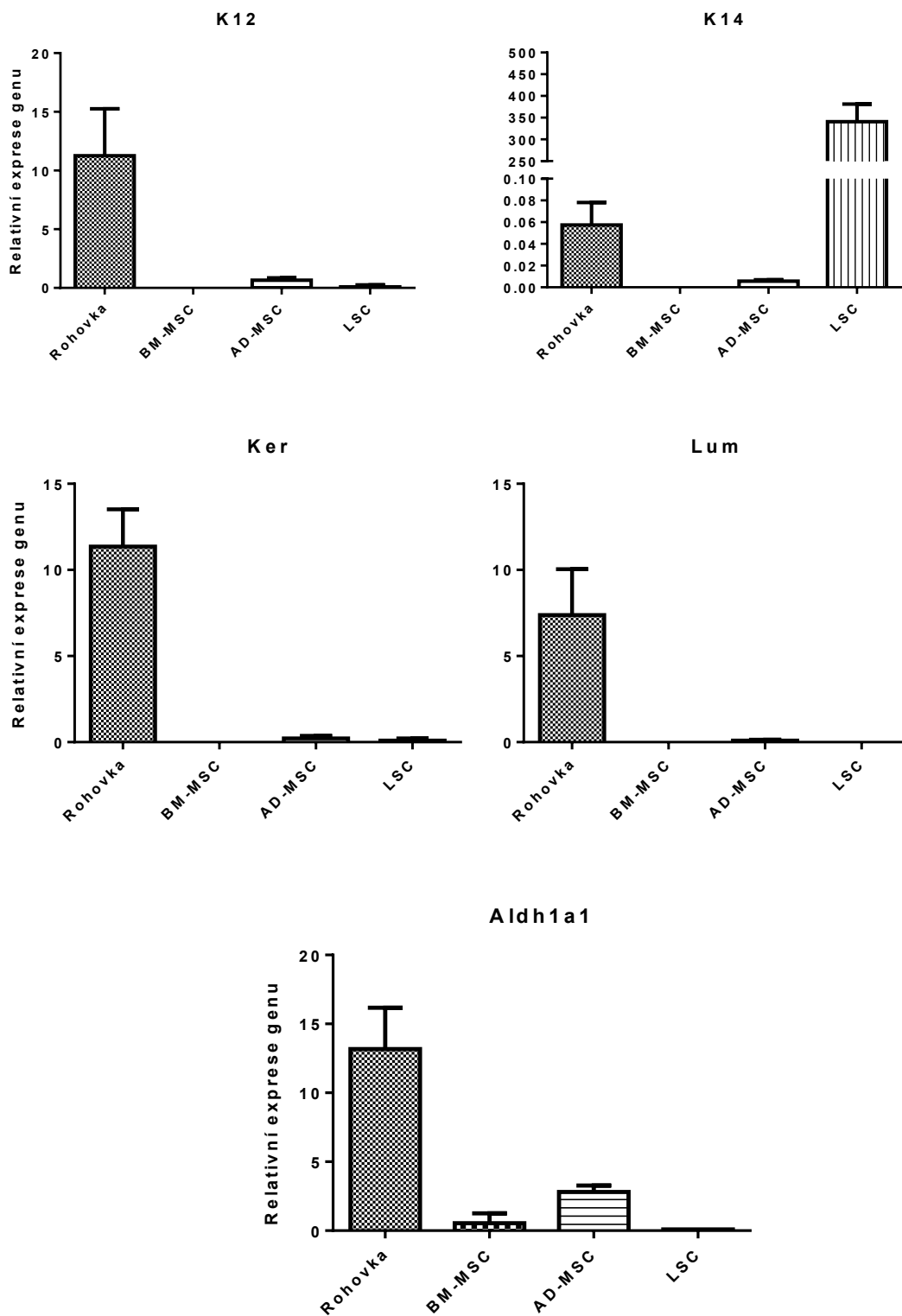
Obrázek 7: **Růstové vlastnosti LSC a MSC**

Růstové vlastnosti LSC, BM-MSC a AD-MSC byly analyzovány pomocí WST-1 testu metabolické aktivity u třech počátečních koncentrací buněk – 3000 buněk na jamku 24jamkové destičky (A), 10000 buněk na jamku (B) a 30000 buněk na jamku (C) v čase 0, 24 a 48 hodin. Data představují průměr ze dvou nezávislých pokusů.

6.2.4 Porovnání exprese genů pro znaky rohovky u použitých SC

Pomocí analýzy genové exprese jsme určili, zda použité SC neexprimují některý ze znaků rohovky pro potvrzení jejich kmenovosti a zda je znak rohovkového epitelu cytokeratin K12 exprimován po terapii. BM-MSC ani AD-MSC po kultivaci neexprimují

K12, KER, LUM ani ALDH1A1 (Obr. 8). K14 je jedním ze znaků limbální tkáně a je v malém množství exprimován i v periferních částech rohovky (Di Girolamo et al. 2015).

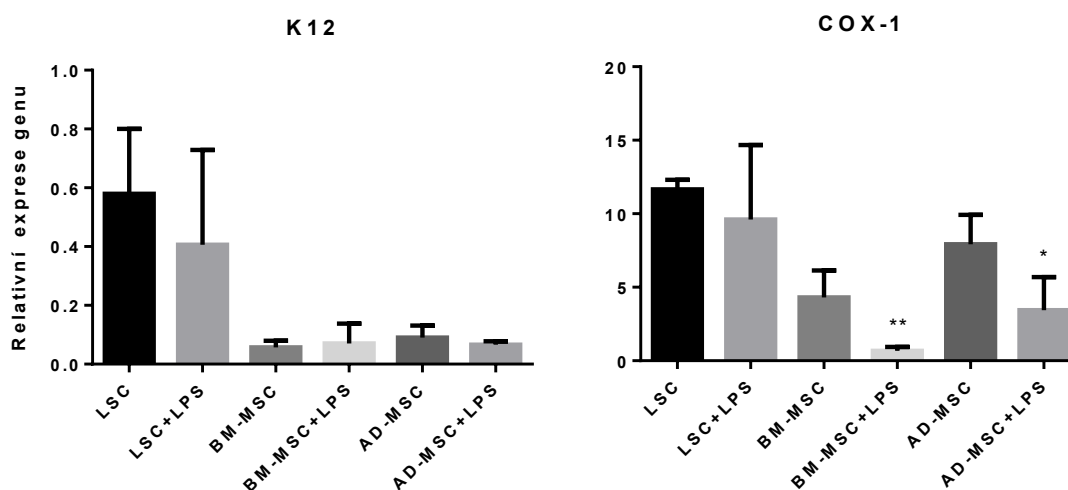


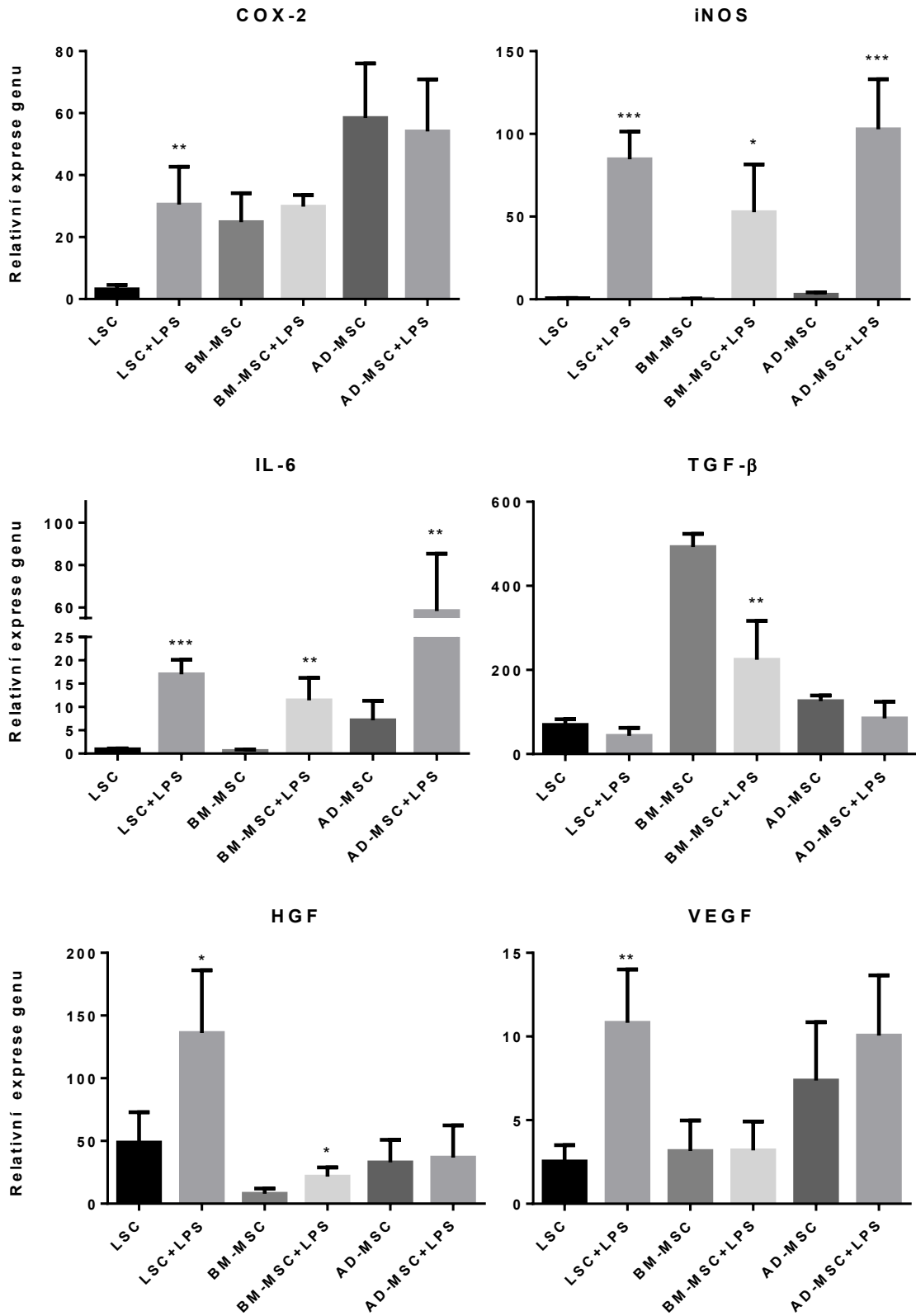
Obrázek 8: Expresse genů asociovaných s rohovkou u použitých SC

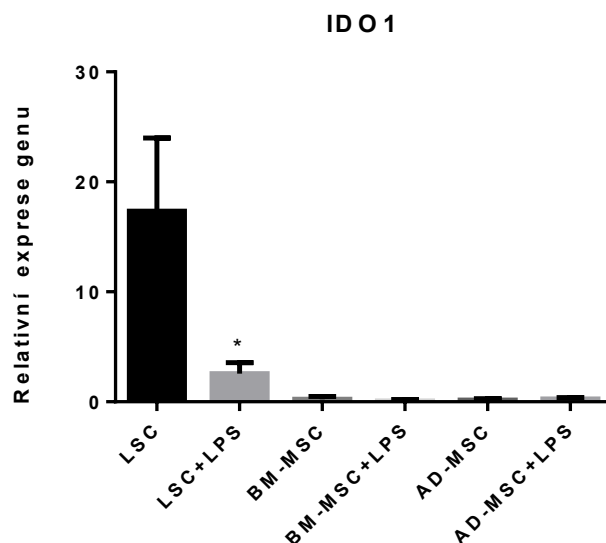
Pomocí real.time PCR byla analyzována exprese genu pro cytokeratin K12 a K14, keratocan (Ker), lumican (Lum) a Aldh1a1

6.3 Expresse imunomodulačních molekul u použitých SC

Pro charakterizaci imunomodulačních vlastností SC během zánětlivé reakce byly buňky vystaveny působení LPS. Zároveň byla provedena analýza genové exprese pro znak epitelu rohovky K12, který je exprimován pouze u LSC. COX-1 je exprimován v nestimulovaných MSC, po stimulaci LPS jeho produkce klesá a u LSC je produkován konstitutivně. COX-2 je exprimován u AD i BM-MSK beze změn po stimulaci pomocí LPS. U LSC naopak dojde po stimulaci ke zvýšení exprese. Všechny typy buněk reagují na stimulaci LPS zvýšenou expresí iNOS. TGF- β je konstitutivně produkován všemi typy použitých SC, nejvíce u BM-MSK, u kterých po stimulaci LPS dochází k poklesu produkce TGF- β . U ostatních SC ke změnám v expresi genu pro TGF po stimulaci nedochází. Produkce IL-6 je přítomna po stimulaci pomocí LPS u všech typů analyzovaných SC s největší produkcí u LSC. VEGF je produkován konstitutivně BM-MSK a beze změn po stimulaci LPS, u LSC nastává produkce po stimulaci pomocí LPS a AD-MSK vykazují zvýšenou konstitutivní expresi genu pro VEGF i bez stimulace LPS. MSC neexprimujíIDO před ani po stimulaci LPS. LSC exprimují gen proIDO konstitutivně, ale tato exprese po stimulaci LPS klesá (Obr. 9).







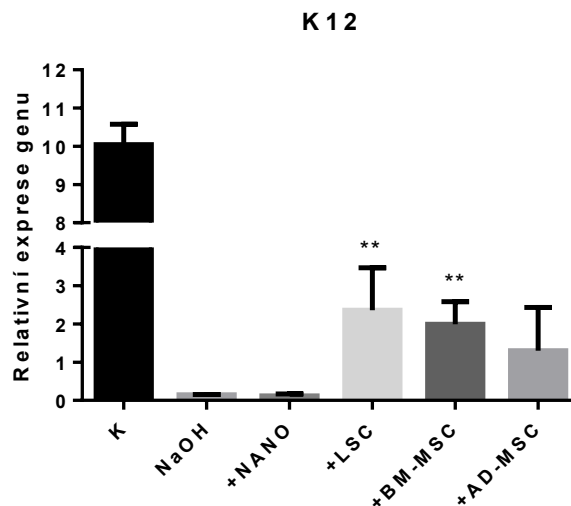
Obrázek 9: **Expresse molekul SC po stimulaci pomocí LPS**

Pomocí real-time PCR byla analyzována exprese genů pro rohovkový epitel cytokeratin K12 (K12), pro cyklooxygenázu 1 a 2 (COX-1 a COX-2), indukibilní NO syntázu (iNOS), interleukin-6 (IL-6), transformující růstový faktor β (TGF- β), růstový faktor hepatocytů (HGF), růstový faktor cévního endotelu (VEGF) a indolamin 2,3-dioxygenázu (IDO1) u nestimulovaných LSC, BM-MSC, AD-MSC a po stimulaci lipopolysacharidem (+LPS). Prezentovaná data jsou výsledkem průměru s +SD ze čtyř nezávislých pokusů (**P<0,01, *P<0,05 stimulované SC proti nestimulovaným)

6.4 Transplantace SC na poškozený povrch oka

6.4.1 Reparace rohovkového epitelu

Rohovky poškozené 0,25M NaOH byly ponechány bez terapie pouze se zašitým víčkem, s našitým nanovlákněným nosičem bez SC, nebo byly ošetřeny pomocí transplantace SC na nanovlákněném nosiči. Samotnou vizuální kontrolou bylo pozorováno zakalení rohovky u očí bez terapie SC a částečné zprůhlednění po léčbě pomocí SC (Obr. 11). Expresse genu pro cytokeratin K12 byla stanovena pomocí real-time PCR. Sedm dní po poškození byla exprese genu pro K12 u poškozené rohovky bez terapie nebo s našitým nanovlákněným nosičem bez SC stále snížena. U rohovek s transplantovanými SC je exprese K12 zvýšena. U AD-MSC se nám nepodařilo toto zvýšení exprese signifikantně prokázat (Obr. 10).

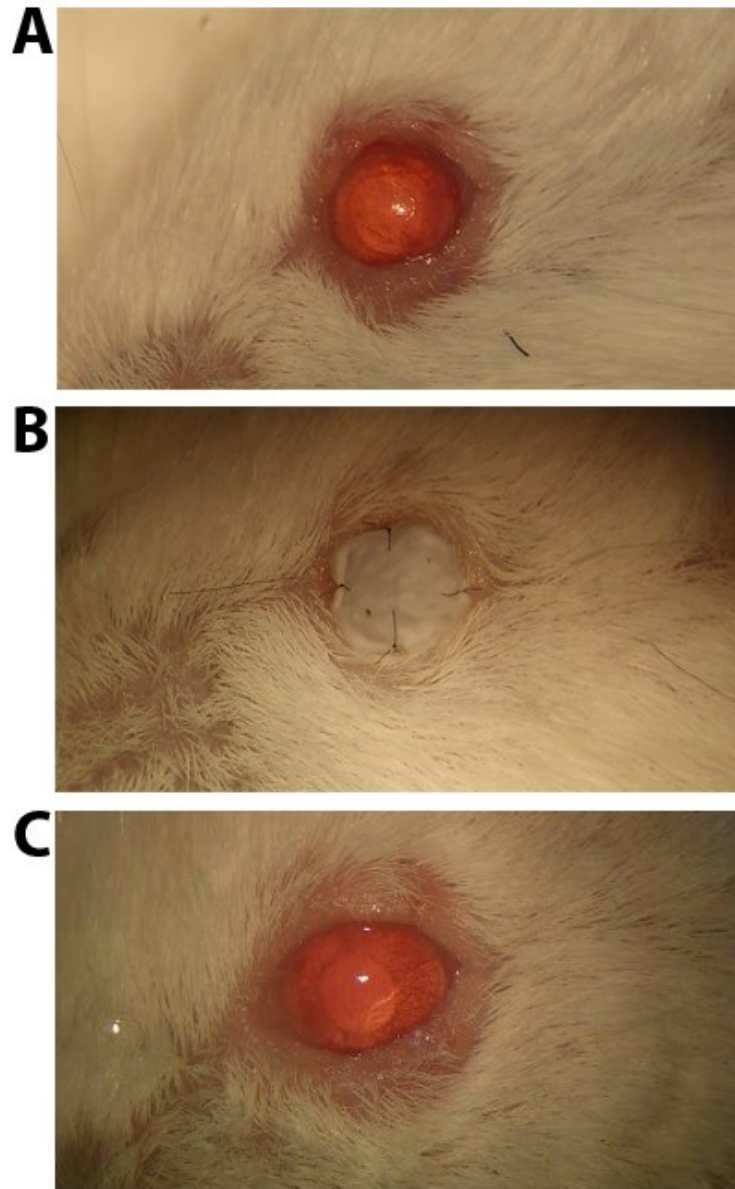


Obrázek 10: Exprese genu pro cytokeratin K12 po poškození rohovky pomocí NaOH a po terapii SC

Expresa genu pro K12 byla stanovena pomocí real-time PCR u kontrolní nepoškozené rohovky (K), poškozené rohovky bez terapie (NaOH), rohovky s našitým nosičem (+NANO) a u rohovek po terapii pomocí +LSC, +BM-MSC a +AD-MSC na nanovláčném nosiči. Data představují průměr s +SD ze sedmi nezávislých pokusů (*P<0,05 oproti neléčené rohovce - NaOH)

6.5 Vliv transplantovaných SC na expresi genů pro cytokiny a další molekuly v poškozené rohovce a po terapii

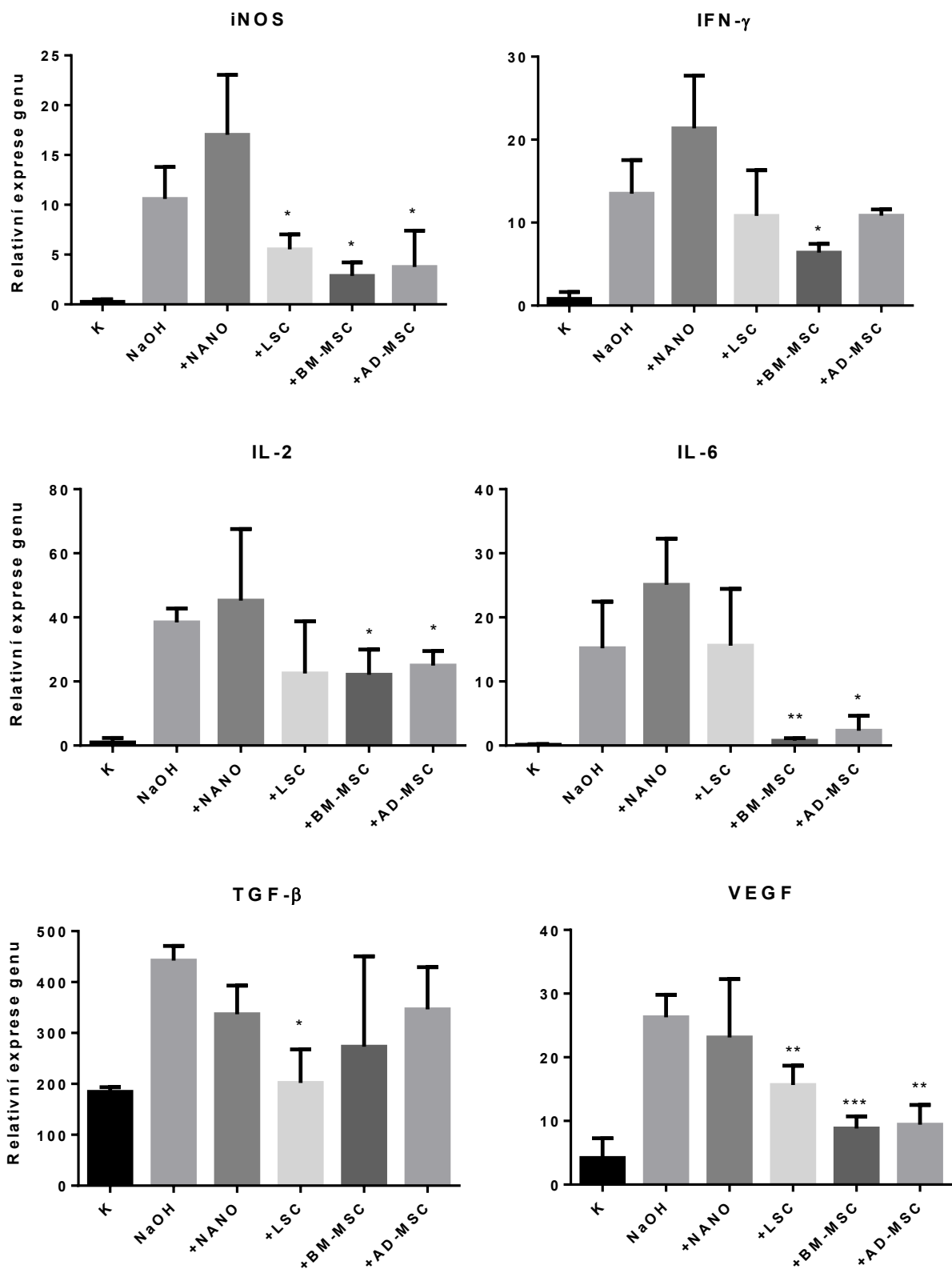
Po poškození rohovky dochází k zánětlivé reakci spojené s produkcí prozánětlivých cytokinů a dalších faktorů spojených se zánětem. Pozorovanými cytokiny jsou IL-2, IFN- γ , VEGF a TGF- β . Dále je sledována exprese pro gen iNOS. Pomocí analýzy genové exprese pro tyto cytokiny a prozánětlivé mediátory byl naměřen pokles exprese prozánětlivých cytokinů IL-2, IFN- γ i VEGF oproti neléčené rohovce nebo rohovce s nanovláčným nosičem bez SC. Dále je inhibována exprese enzymu iNOS. Protizánětlivý TGF- β je produkován buňkami zdravé rohovky, po poškození je exprese genu pro TGF- β zvýšena. Po transplantaci nanovláčného nosiče s LSC, BM-MSC a AD-MSC, ale i samotného nosiče bez SC došlo k částečnému poklesu exprese pro TGF- β , ale je stále vyšší než exprese u zdravé rohovky (Obr. 12).



Obrázek 11: **Vizuální kontrola regenerace očního povrchu po transplantaci SC**

Po poškození pomocí NaOH byly na rohovku transplantovány SC pomocí nanovláčenného nosiče (B). Po třech dnech byl nosič odstraněn a po dalších čtyřech dnech byly rohovky odebrány k analýze pomocí real-time PCR. Po 7 dnech byla většina rohovek bez transplantovaných SC stále zakalená (A). Povrch oka po léčbě kmenovými buňkami (C) byl průhledný a byly viditelné struktury nacházející se pod rohovkou (zornice, duhovka).

Zánětlivá reakce je inhibována transplantovanými SC (pokles IL-2, IFN- γ , iNOS). Zároveň je dále produkován TGF- β , který hraje důležitou roli v posunu imunitní odpovědi ve směru Treg lymfocytů a v modulaci růstu epitelu očního povrchu. Snížení produkce VEGF může příznivě ovlivnit inhibici neovaskularizace, která nastává po poškození rohovky a během LSCD.



Obrázek 12: Expresa genů pro cytokiny a další molekuly spojené se zánětem po léčbě poškozeného povrchu oka pomocí SC

Pomocí real-time PCR byly analyzovány geny pro inducibilní NO syntázu (iNOS), interferon- γ (IFN- γ), interleukiny 2 a 6 (IL-2 a IL-6), transformující růstový faktor β (TGF- β) a růstový faktor

cévního endotelu (VEGF) u kontrolní rohovky bez poškození (K), poškozené rohovky (NaOH) bez terapie, s našitým nanovlákněným nosičem (+NANO), nebo po terapii pomocí +LSC, +BM-MSK a +AD-MSK. Výsledná data jsou průměry s +SD z osmi nezávislých pokusů (*P<0,05 oproti neléčené rohovce - NaOH).

7. Diskuze

Po rozsáhlém poškození povrchu oka, včetně oblasti limbu, dochází ke vzniku LSCD a k vážné poruše regenerace rohovkového epitelu. Při poškození jednoho oka je možné odebrat část limbu ze zdravého a transplantovat ji na oko poškozené nebo z odebrané části limbu vyizolovat LSC, namnožit *in vitro* a na vhodném nosiči natransplantovat na poškozenou rohovku. Při oboustranném poškození není tento postup možný a je potřeba transplantovat limbus nebo LSC od alogenního dárce. V takovém případě je nutné podávat imunosupresivní léky, které mají různé vedlejší účinky a pacienty je potřeba dlouhodobě sledovat. Vhodnou alternativou by mohly být buňky získané z těla pacienta, mezi které patří SC vlasového folikulu (Meyer-Blazejewska et al. 2011), OMEC (Kolli et al. 2014), SC zubní dřeně (Syed-Picard et al. 2015) a v neposlední řadě MSC, které se nacházejí v mnoha tkáních lidského těla jako v pupečnickové krvi, ve Whartonově rosolu, v kosterním svaly, v zubní dřeni, ale i v rohovce a limbu. Pro výzkumné účely jsou nejvhodnější MSC získané z tukové tkáně (Rodriguez et al. 2005) nebo kostní dřeně (Friedenstein et al. 1970), které představují vhodné a poměrně snadno dostupné zdroje SC pro terapii poškozené rohovky.

LSC představují vhodný typ SC pro léčbu LSCD, jejich transplantace u pacientů na poškozený povrch oka zaznamenala úspěšné obnovení zraku (pacienti se zhoršenou kvalitou vidění nebo trpících slepotou) (Rama et al. 2010; Sangwan et al. 2011; Basu et al. 2012; Pellegrini et al. 2014). Během experimentů byly LSC izolovány z myších limbů a kultivovány standardní technikou. Pomocí průtokové cytometrie byla u nich zjištěna exprese povrchového znaku CD105 a nepřítomnost povrchových znaků hematopoetické linie CD11b a CD31 stejně jako u MSC. Adipogenní a osteogenní diferenciaci u LSC probíhala méně v porovnání s MSC. Oproti BM-MSK je tato diferenciací schopnost LSC téměř zanedbatelná. Při osteogenní diferenciaci byl u LSC a BM-MSK osteopontin a osteogenin exprimován ve vyšší míře než u testovaných AD-MSK. LSC po kultivaci v RPMI mediu po dobu 72 hodin exprimovaly v malém množství znak rohovkového epitelu K12. Tato exprese může být způsobena spontánní diferenciací těchto buněk během kultivace nebo mohl být tento znak exprimován již před izolací v limbální tkáni, kde se nachází různá stadia diferencujících se buněk pocházejících z LSC a dalších buněk limbu. Nicméně takto izolované a kultivované buňky byly již dříve úspěšně použity v terapii poškozené rohovky s LSCD a jsou označovány jako LSC (Pellegrini et al. 1997; Rama et al. 2010). Vhodnou alternativou při rozsáhlém oboustranném poškození rohovky a následném vzniku LSCD mohou být MSC izolované v dostatečném množství z tukové tkáně nebo kostní dřeně

pacienta a jsou poměrně snadno kultivovány *in vitro*. MSC jsou schopny se diferencovat např. v buňky tukové nebo kostní tkáně. V našich pokusech AD-MSC snáze diferencovaly v buňky tukové tkáně a BM-MSC v buňky kostní tkáně. V porovnání s LSC mají oba typy MSC vyšší schopnost diferenciaci v buňky tukové tkáně, u osteogenní diferenciaci LSC vykazovaly v analýze pomocí real-time PCR vyšší diferenciační schopnost než AD-MSC. MSC po kultivaci, na rozdíl od LSC, neexprimují K12.

Pozorovali jsme růstové vlastnosti LSC a obou typů MSC ve třech různých koncentracích (3000, 10000 a 30000 buněk na jamku 24jamkové destičky) v časech 0, 24 a 48 hodin. Nejlépe rostly všechny typy buněk při nejvyšší koncentraci (30000 buněk). V dalších pokusech jsme proto používali při kultivaci MSC a LSC na nanovlákněném nosiči vyšší koncentrace buněk, abychom dosáhli optimálního nárůstu buněk před transplantací na poškozený povrch oka. V dřívější práci bylo ukázáno, že LSC a MSC kultivované na nanovlákněných nosičích mají srovnatelnou metabolickou aktivitu jako LSC a MSC rostoucí na plastu (Zajicova et al. 2010).

Pomocí průtokové cytometrie byla u AD-MSC a BM-MSC zjištěna přítomnost CD44 a CD105. Tyto buňky neexprimují CD31. Expresí těchto znaků, adherencí k plastu a schopností diferencovat v adipocyty a osteocyty jsme ověřili kritéria, podle kterých jsou MSC definovány (Dominici et al. 2006).

Model poškození povrchu oka byl optimalizován tak, aby nedocházelo k poškození hlubších struktur oka nacházejících se pod rohovkou a aby se rohovka ani po 14 dnech sama neregenerovala. Nejvhodnější koncentrace je 0,25M NaOH a čas 25 vteřin. V poškozené rohovce jsme pomocí analýzy exprese genů pro prozánětlivé molekuly jako IL-2, IFN- γ a iNOS potvrdili zánětlivou reakci, která v rohovce přetrvávala 14 dní od jejího poškození.

Námi použité typy SC produkují spontánně nebo po stimulaci LPS řadu růstových nebo imunoregulačních faktorů. LSC, BM-MSC a AD-MSC exprimují iNOS až po stimulaci LPS. BM-MSC ani LSC neprodukují IL-6 konstitutivně, jeho hladina se až po stimulaci LPS zvyšuje. AD-MSC exprimují spontánně gen pro IL-6 i bez stimulace. Tato produkce IL-6 je jedním z mechanismů inhibujícím produkci IgG B lymfocyty (Rasmusson et al. 2007). MSC také mohou pomocí IL-6 stimulovat DC k diferenciaci na buňky s tolerogenním fenotypem (Deng et al. 2014). Produkce NO je u MSC stimulována prozánětlivými faktory (Ren et al. 2009), což jsme potvrdili sledováním zvýšené exprese iNOS po stimulaci LPS. Expresí HGF je vyšší po stimulaci LPS u LSC, AD-MSC produkují HGF konstitutivně bez většího vlivu LPS. U BM-MSC je hladina exprese HGF po stimulaci vyšší. VEGF je konstitutivně exprimován AD-MSC i BM-MSC, přičemž u BM-MSC je exprimovaná hladina genu pro

VEGF vyšší. LSC exprimují gen pro VEGF až po stimulaci pomocí LPS. Hladina exprese genů pro růstové faktory HGF a VEGF může být po stimulaci prozánětlivými faktory (IL-1, TNF- α , IFN- γ) zvýšena a napomáhá tak regeneraci tkání (Li and Tseng 1995; Yoon et al. 2010). HGF je spojován s migrací LSC do rohovky po poškození, což by mohlo potvrzovat velký nárůst exprese HGF u stimulovaných LSC. V našem případě se zvýšení exprese genu pro HGF potvrdilo pouze u LSC a BM-MSC. VEGF je po stimulaci pomocí LPS exprimován ve zvýšené míře pouze u LSC.

MSC spontánně produkují TGF- β . Tato produkce je podpořena stimulací protizánětlivými faktory (IL-10, TGF- β), po stimulaci LPS naopak dochází pouze ke zvýšené produkci IL-6 (Svobodova et al. 2012). To jsme potvrdili analýzou exprese genů pro TGF- β , který byl exprimován konstitutivně. Pouze u BM-MSC došlo po stimulaci LPS k poklesu. COX-1 je exprimován u všech typů použitých buněk. U BM-MSC a AD-MSC došlo k signifikantnímu poklesu po stimulaci. COX-2 je konstitutivně exprimována v obou použitých typech MSC a nebyla pozorována zvýšená exprese po stimulaci pomocí LPS. U LSC je COX-2 exprimována až po kultivaci s LPS.

Po poškození rohovky dochází k zánětlivé reakci a k lokální produkci prozánětlivých cytokinů jako IL-2, IL-6 a IFN- γ a exprese iNOS je zvýšena. Je přítomna neovaskulizace rohovky, která je spojená s expresí VEGF a buňky rohovky reagují na poškození zvýšenou expresí TGF- β . Dříve bylo potvrzeno, že MSC a LSC migrují z transplantovaného nanovláčenného nosiče na mechanicky poškozený povrch oka myši a tlumí zánětlivou reakci (Zajicova et al. 2010) a že transplantace MSC na nanovláčenném nosiči na chemicky poškozenou rohovku králíka pomocí NaOH tlumí lokální zánětlivou reakci (Cejkova et al. 2013; Holan et al. 2015). V dalších pracích byly MSC na povrch oka transplantovány již předdiferencované po kultivaci s buňkami rohovkového stromatu nebo s LSC a docházelo k inhibici zánětlivé reakce a ke zprůhlednění rohovky (Jiang et al. 2010; Rohaina et al. 2014).

Týden po transplantaci SC byly rohovky odebrány a analýzou genové exprese prozánětlivých cytokinů, růstových faktorů a iNOS byl zhodnocen vliv použitých buněk na lokální zánět. Analýzou genové exprese znaku rohovky K12 byla pozorována regenerace rohovkového epitelu. Po aplikaci SC jsme zaznamenali inhibici lokálního zánětu v léčených rohovkách. Signifikantní pokles exprese genu pro iNOS nastal u rohovky léčených všemi typy použitých SC. Inhibována byla i produkce prozánětlivých cytokinů IL-2 a IL-6 (v obou případech signifikantně pouze u BM-MSC a AD-MSC), IFN- γ byl signifikantně utlumen pouze v rohovkách ošetřených transplantovanými BM-MSC. Exprese genu pro VEGF byla

signifikantně snížena u všech tří typů buněk. Transplantované SC inhibují expresi VEGF, čímž mohou zabránit vzniku neovaskularizací. Regenerace rohovkového epitelu byla pozorována jak vizuálně, tak pomocí analýzy exprese genu pro K12. Léčba pomocí LSC a BM-MSC transplantovaných na nanovláčenném nosiči podporuje reepitelizaci rohovky. U rohovek léčených AD-MSC dochází také ke zvýšení exprese genu pro K12, ale nepodařilo se nám tento nárůst signifikantně prokázat. Inhibice lokální produkce prozánětlivých cytokinů a inhibice neovaskularizace po transplantaci MSC a LSC byla ukázána v dřívějších pracích (Pellegrini et al. 1997, Rama et al. 2010; Rohaina et al. 2014, Cejkova et al. 2015, Holan et al. 2015). V jiných studiích dochází k mírnému účinku již při samotné aplikaci nanovláčenného nosiče na poškozený povrch oka (Cejkova et al. 2013; Holan et al. 2015). V tomto případě naopak rohovky s našitým nanovláčenným nosičem bez buněk vykazovaly zvýšenou hladinu prozánětlivých cytokinů a iNOS. U exprese genů pro TGF- β a VEGF neměl samotný nanovláčenný nosič na terapii žádný účinek.

Terapie poškozené rohovky pomocí BM-MSC inhibovala expresi všech prozánětlivých cytokinů, iNOS a VEGF. Terapie transplantací BM-MSC je srovnatelná s LSC během regenerace rohovkového epitelu. AD-MSC snižují expresi IL-2, IL-6 a iNOS. Vliv na snížení exprese IFN- γ a zvýšení exprese K12 po terapii nebyl signifikantní. Použitím vhodného typu MSC by bylo možné urychlit reepitelizaci rohovky a zároveň inhibovat lokální zánětlivou reakci během léčby poškozeného povrchu oka a LSCD.

8. Závěr

U myši byl použit model poškození rohovky, při kterém bylo oko poškozeno 0,25M roztokem NaOH po dobu 25 vteřin. Pomocí vizuální kontroly (mikroskopicky) bylo ověřeno, že je rohovka poškozena dostatečně a rohovkový epitel se výrazně neobnovuje ani 7. a 14. den po poškození. To bylo potvrzeno analýzou genové exprese pro znaky pro rohovkový epitel a rohovku (K12, Ker, Lum). V rohovce po poškození dochází k lokální zánětlivé reakci a ke zvýšení genové exprese pro molekuly spojené se zánětem: IL-2, L-6, IFN- γ , iNOS, VEGF a TGF- β .

Analýzou exprese pro povrchové znaky průtokovou cytometrií jsme si ověřili, že námi kultivované MSC splňují kritéria kmenovosti podle definice stanovené Mezinárodní společností pro buněčnou terapii. Testem metabolické aktivity jsme určili nejnižší možnou koncentraci buněk pro kultivaci námi použitých SC na nanovlákněném nosiči a pomocí analýzy genové exprese jsme si ověřili, že použité SC neexprimují žádný z běžně popisovaných znaků rohovky. Pouze LSC exprimují určité množství znaku K12 kvůli samovolné diferenciaci nebo odběru již diferencovaných buněk, které se nacházejí v limbu.

Expese imunomodulačních molekul po stimulaci pomocí LPS byla ověřena opět pomocí analýzy genové exprese. COX-2 je konstitutivně exprimována u obou typů MSC, u LSC je exprese přítomná až po stimulaci LPS. IL-6 a iNOS jsou exprimovány po stimulaci u všech typů použitých buněk. TGF- β je exprimován konstitutivně u všech typů buněk. U LSC je tato exprese nejnižší a u BM-MSK nejvyšší. U BM-MSK je tato exprese po stimulaci signifikantně snížena. HGF je konstitutivně tvořen u AD-MSK, u BM-MSK dochází k expresi HGF až po stimulaci pomocí LPS. LSC exprimují tuto molekulu konstitutivně a po kultivaci s LPS je exprese signifikantně zvýšená, což nejspíše ukazuje na roli HGF v regeneračních pochodech rohovky. VEGF je konstitutivně exprimován u obou typů MSC, u AD-MSK je tato exprese vyšší. U LSC je exprese zvýšena po stimulaci.IDO není u MSC konstitutivně exprimován a ani po stimulaci pomocí LPS. K produkci IDO je třeba stimulace IFN- γ .

Pro transplantaci SC na poškozený povrch oka byl použit nanovlákněný nosič, který byl na oku ponechán po dobu tří dnů, a poté byl nosič odstraněn. Po dalších čtyřech dnech bylo oko odebráno pro analýzu exprese genů lokálně produkovaných cytokinů a molekul spojených se zánětem. Vizuálně lze po terapii pozorovat zvýšenou průhlednost rohovky. Terapie SC má signifikantní vliv na tlumení lokálního zánětu. V případě inhibice exprese zánětlivých cytokinů IL-2 a IL-6 mají AD-MSK a BM-MSK podobné schopnosti

a transplantace obou typů buněk signifikantně tlumí produkci těchto cytokinů. Expze IFN- γ je inhibována signifikantně u terapie pomocí BM-MSK. Expze VEGF je signifikantně inhibována všemi typy použitých buněk a nejvíce BM-MSK. Hladina expze TGF- β je zvýšena po poškození rohovky. TGF- β je konstitutivně exprimován i po transplantaci SC a nejspíš hraje roli v regeneraci rohovky.

Obnova rohovkového epitelu po terapii byla sledována pomocí expze cytokeratinu K12. Epitel je signifikantně regenerován po transplantaci LSC a BM-MSK, jejichž účinek je srovnatelný. U AD-MSK se nám signifikantní účinek nepodařilo prokázat, nicméně je K12 po jejich transplantaci na poškozenou rohovku také exprimován ve zvýšené míře než u rohovky bez terapie.

Terapie pomocí SC buněk má vliv na snížení lokální expze genů pro prozánětlivé cytokiny a další molekuly spojené se zánětem. BM-MSK mají srovnatelný účinek na obnovu rohovkového epitelu jako terapie pomocí LSC. Naše výsledky ukazují vhodnost použití MSK k terapii poškozeného povrchu oka díky jejich imunomodulačním vlastnostem, ke kterým patří tlumení lokální zánětlivé reakce, snižování expze VEGF, a tedy snižování rizika neovaskularizace a urychlení regenerace rohovkového epitelu.

9. Seznam literatury

- Aggarwal, S., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815–22.
- Alawad, A., Saleh A., Aljarbu, A., Kryczek, I., Niu, Y., Al-sobayil Fahd, A., Chang, C., et al. 2015. Depletion of androgen receptor (AR) in mesenchymal stem cells inhibits induction of CD4+CD25+FOX3+ regulatory T cells via androgen TGF- β interaction. *Journal of Applied Biomedicine* 7: doi:10.1016/j.jab.2015.06.002.
- Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C., Kuroda, Y., Kandeel, Y., Mullen, Y., 2009. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental Hematology* 37: 604–15.
- Basu, S., Ali, H., Sangwan, VS., 2012. Clinical outcomes of repeat autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns. *American Journal of Ophthalmology* 153: 643–50.
- Bernardo, ME., Fibbe, WE., 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13: 392–402.
- Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., Noël, D., 2010. IL-6 dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* 5: e14247.
- Brown, KD., Low, S., Mariappan, I., Abberton, KM., Short, R., Zhang, H., Maddileti, S., Sangwan, V., Steele, D., Daniell, M., 2014. Plasma polymer-coated contact lenses for the culture and transfer of corneal epithelial cells in the treatment of limbal stem cell deficiency. *Tissue Engineering Part A* 20, 646-55.
- Cejkova, J., Trosan, P., Cejka, C., Lencova, A., Zajicova, A., Javorkova, E., Kubinova, S., Sykova, E., Holan V. 2013. Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Experimental Eye Research* 116: 312–23.
- Corcione, A., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107: 367–72.
- Cursiefen, C., Maruyama, K., Bock, F., Saban, D., Sadrai, Z., Lawler, J., Dana, R., Masli, S., 2011. Thrombospondin 1 inhibits inflammatory lymphangiogenesis by CD36 ligation on monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 208: 1083–92.
- Cvija, H., Kovacic, N., Katavic, V., Ivcevic, S, Aguila, HL., Marusic, A., Grcevic, D., 2012. Chemotactic and immunoregulatory properties of bone cells are modulated by endotoxin-stimulated lymphocytes. *Inflammation* 35: 1618–31.
- Davanger, M., Evensen, A., 1971. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 229: 560–1.
- Daya, SM., Watson, A., Sharpe, JR., Giledi, O., Rowe, A., Martin, R., James, SE., 2005. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 112: 470–7.
- Deng, Y., Yi, S., Wang, G., Cheng, J., Zhang, Y., Chen, W., Tai, Y., et al. 2014. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells instruct dendritic cells to acquire tolerogenic phenotypes through the IL-6-mediated upregulation of SOCS1. *Stem Cells and Development* 23: 2080–92.
- De Paiva, CS., Chen, Z., Corrales, RM., Pflugfelder, SC., Li, DQ., 2005. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 23: 63–73.
- Di Girolamo, N., Bobba, S., Raviraj, V., Delic, NC., Slapetova, I., Nicovich, PR., Halliday, GM., Wakefield, D., Whan, R., Lyons, JG., 2015. Tracing the fate of limbal epithelial progenitor cells in the murine cornea: progenitor cell fate in the cornea. *Stem Cells* 33: 157–69.
- Di Girolamo, N., Chui, J., Wakefield, D., Coroneo, MT., 2006. Cultured human ocular surface epithelium on therapeutic contact lenses. *British Journal of Ophthalmology* 91: 459–64.
- Di Iorio, E., 2005. Isoforms of Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 9523–8.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, FC., Krause, DC., Deans, RJ., Keating, A., Prockop, DJ., Horwitz, EM., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 8: 315–7.

- Dua, HS., Miri, A., Alomar, T., Yeung, AM., Said, DG., 2009. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance. *Ophthalmology* 116: 856–63.
- Dua, HS., 2005. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *British Journal of Ophthalmology* 89: 529–32.
- Dua, HS., Gomes, JA., Singh, A., 1994. Corneal epithelial wound healing. *British Journal of Ophthalmology* 78: 401–8.
- Echevarria, TJ., Girolamo, N., 2010. Tissue-regenerating, vision-restoring corneal epithelial stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports* 7: 256–68.
- English, K., Barry, FP., Field-Corbett, CP., Mahon, BP., 2007. IFN- γ and TNF- α Differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters* 110: 91–100.
- 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: 187–95.
- Friedenstein, AJ., Chailakhjan, RK., Lalykina, KS., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation* 3: 393–403.
- Friedenstein, AJ., Piatetzky-Shapiro, II., Petrakova, KV., 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 16: 381–90.
- Gabison, E., Chang, JH., Hernández-Quintela, E., Javier, J., Lu, PCS., Ye, H., Kure, T., Kato, T., Azar, DT., 2004. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Experimental Eye Research* 78: 579–89.
- Garfias, Y., Nieves-Hernandez, J., Garcia-Mejia, M., Estrada-Reyes, C., Jimenez-Martinez, MC., 2012. Stem cells isolated from the human stromal limbus possess immunosuppressant properties. *Molecular Vision* 18: 2087–95.
- Ghannam, S., Pene, J., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., a Yssel, H., 2010. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *The Journal of Immunology* 185: 302–12.
- Goldberg, MF., Bron, AJ., 1982. Limbal palisades of Vogt. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 80: 155–71.
- Gomes, JAP., Monteiro, BG., Melo, GB., Smith, RL., da Silva, MCP., Lizier, NF., Kerkis, A., Cerruti, H., a Kerkis, I., 2009. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51: 1408–14.
- Gu, S., Xing, C., Han, J., Tso, M., Hong, J., 2009. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Molecular Vision* 15: 99–107.
- Hajkova, M., Javorkova, E., Zajicova, A., Trosan, P., Holan, V., Krulova, M., 2015. A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A Attenuates Immune Response by a Switch in Macrophage Phenotype: MSCs induce immunosuppressive macrophages *in vivo*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, doi: 10.1002/term.2044.
- Harkin, DG., Foyn, L., Bray, LJ., Sutherland, AJ., Li, FJ., Cronin, BG., 2015. Concise reviews: can mesenchymal stromal cells differentiate into corneal cells: A systematic review of published data: Corneal differentiation of MSC. *Stem Cells* 33: 785–91.
- Holan, V., Chudickova, M., Trosan, P., Svobodova, E., Krulova, M., Kubinova, S., Sykova, E. et al., 2011. Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *Journal of Controlled Release* 156: 406–12.
- Holan, V., Pokorna, K., Prochazkova, J., Krulova, M., Zajicova, A., 2010. Immunoregulatory properties of mouse limbal stem cells. *The Journal of Immunology* 184: 2124–9.
- Holan, V., Trosan, P., Cejka, C., Javorkova, E., Zajicova, A., Hermankova, B., Chudickova, M., Cejkova, J., 2015. A comparative study of the therapeutic potential of mesenchymal stem cells and limbal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction. *Stem Cells Translational Medicine*, doi:10.5966/sctm.2015-0039.
- Hori, J., Wang, M., Miyashita, M., Tanemoto, K., Takahashi, K., Takemori, T., Okumura, K., Yagita, H., Azuma, M., 2006. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. *Journal of Immunology* 177: 5928–35.

- Chae, JJ., Ambrose, WM., Espinoza, FA., Mulreany, DG., Ng, S., Takezawa, T., Trexler, MM., Schein, OD., Chuck, RS., Elisseff, JF., 2015. Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency. *Acta Ophthalmologica* 93: 57–66.
- Chamberlain, G., Wright, K., Rot, A., Ashton, B., Middleton, J., 2008. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *PLoS One* 3: e2934.
- Chen, JJ., Tseng, SS., 1991. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 32: 2219–33.
- Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A., Frassoni, F. et al., 2011. Mesenchymal Stem Cells Impair in Vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 17384–9.
- Cho, D., Kim, MR., Jeong, H., Jeong, HC., Jeong, MH., Yoon, SH., Kim, YS., Ahn, Y., 2014. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & Molecular Medicine* 46: e70.
- Chung, R., Foster, BK., Zannettino, ACW., Xian, CJ., 2009. Potential roles of growth factor PDGF in the bony repair of injured growth plate. *Bone* 44: 878–85.
- Inatomi, T., Nakamura, T., Koizumi, N., Sotozono, C., Yokoi, N., Kinoshita, S., 2006. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *American Journal of Ophthalmology* 141: 267–75.
- Javorkova, E., Trosan, P., Zajicova, A., Krulova, M., Hajkova, M., Holan, V., 2014. Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered Interferon- γ -treated mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Development* 23: 2490–2500.
- Jiang, T., Cai, L., Ji, WY., Hui, YN., Wang, YS., Hu, D., Zhu, J., 2010. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Molecular Vision* 16: 1304–16.
- Jiang, XX., 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105: 4120–6.
- Kenyon, KR., Tseng, SC., 1989. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96: 709–22.
- Kim, J., Hematti, P., 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A Novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* 37: 1445–53.
- Kolli, S., Ahmad, S., Mudhar, HS., Meeny, A., Lako, M., Figueiredo, FC., 2014. Successful application of ex vivo expanded human autologous oral mucosal epithelium for the treatment of total bilateral limbal stem cell deficiency: OME transplantation in patients with bilateral LSCD. *Stem Cells* 32: 2135–46.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V. et al., 2006. Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 386–98.
- Krulova, M., Pokorna, K., Lencova, A., Fric, J., Zajicova, A., Filipec, M., Forrester, JV., Holan, V., 2008. A Rapid separation of two distinct populations of mouse corneal epithelial cells with limbal stem cell characteristics by centrifugation on percoll gradient. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49: 3903–8.
- Lan, Y., Kodati, S., Lee, HS., Omoto, M., Jin, Y., Chauhan, SK., 2012. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53: 3638–44.
- Le Blanc, K., Davies, DC., 2015. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunology Letters*, doi:10.1016/j.imlet.2015.05.004.
- Le Blanc, K., Tammik, J., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringdén, O., 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 31: 890–6.
- Lehrer, MS., Sun, TT., Lavker, RM., 1998. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *Journal of Cell Science* 111: 2867–75.

- Lenčová, A., Pokorná, K., Zajícová, A., Krulová, M., Filipec, M., Holáň, V., 2011. Graft survival and cytokine production profile after limbal transplantation in the experimental mouse model. *Transplant Immunology* 24: 189–94.
- Li, DQ., Tseng, SCG., 1995. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *Journal of Cellular Physiology* 163: 61–79.
- Li, H., Jiang, YM., Jiang, XX., Guo, XM., Ning, HM., Li, YH., Liao, L. et al., 2014. CCR7 guides migration of mesenchymal stem cell to secondary lymphoid organs: A novel approach to separate GvHD from GvL effect: Separation of GvHD and GvL by SLO-migrating MSCs. *Stem Cells* 32: 1890–1903.
- Li, M., Sun, X., Kuang, X., Liao, Y., Li, H., Luo, D., 2014. Mesenchymal stem cells suppress CD8⁺ T Cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member d protein receptor expression and secretion of prostaglandin E 2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- β : mesenchymal stem cells suppress CD8⁺ T cells. *Clinical & Experimental Immunology* 178: 516–24.
- Liu, H., Zhang, J., Liu, CH., Hayashi, Y., Kao, WWY., 2012. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16: 1114–24.
- Liu, H., Zhang, J., Liu, CY., Wang, JJ., Sieber, M., Chang, J., Jester, JV., Kao, WWY., 2010. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: Lumican null mice. *PloS One* 5: e10707.
- Li, W., Hayashida, Y., Chen, YT., Tseng, SCG., 2007. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Research* 17: 26–36.
- Luengo Gimeno, F., Lavigne, V., Gatto, S., Croxatto, JO., Correa, L., Gallo, JE., 2007. Advances in corneal stem-cell transplantation in rabbits with severe ocular alkali burns. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* 33: 1958–65.
- Maddula, S., Davis, DK., Maddula, S., Burrow, MK., Ambati, BK., 2011. Horizons in therapy for corneal angiogenesis. *Ophthalmology* 118: 591–9.
- Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, IM., Nepomnaschy, I., Costa, H. et al. 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PloS One* 5: e9252.
- Ma, Y., Xu, Y., Xiao, Z., Yang, W., Zhang, C., Song, E., Du, Y., Li, L., 2006. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 315–21.
- Mazar, J., Thomas, M., Bezrukov, L., Chanturia, A., Pekkurnaz, G., Yin, S., Kuznetsov, A., Robey, PG., Zimmerberg, J., 2009. Cytotoxicity mediated by the Fas ligand (FasL)-activated apoptotic pathway in stem cells. *Journal of Biological Chemistry* 284: 22022–8.
- Melief, SM., Schrama, E., Brugman, MH., Tiemessen, MM., Hoogduijn, MJ., Fibbe, WE., Roelofs, H., 2013. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages: MSC Induce Tregs through skewing of monocytes. *Stem Cells* 31: 1980–91.
- Meyer-Blazejewska, EA., Call, MK., Yamanaka, O., Liu, H., Schlötzer-Schrehardt, U., Kruse, FE., Kao, WW., 2011. From Hair to Cornea: Toward the therapeutic use of hair follicle-derived stem cells in the treatment of limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 29: 57–66.
- Nakamura, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Koizumi, N., Kinoshita, S., 2015. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Progress in retinal and eye research*, doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.003.
- Nauta, AJ., Kruisselbrink, AB., Lurvink, E., Willemze, E., Fibbe, WE., 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* 177: 2080–7.
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, M., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S. et al. 2004. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *New England Journal of Medicine* 351: 1187–96.
- Oh, JY., Roddy, GW., Choi, H., Lee, RH., Ylostalo, JH., Rosa, RH., Prockop, DJ., 2010. From the cover: Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following

- chemical and mechanical injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 16875–80.
- Ordóñez, P., Di Girolamo, N., 2012. Limbal epithelial stem cells: Role of the niche microenvironment. *Stem Cells* 30: 100–7.
- Pascolini, D., Mariotti, SP., 2012. Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology* 96: 614–8.
- Pellegrini, G. 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 3156–61.
- Pellegrini, G., Rama, P., Di Rocco, A., Panaras, A., De Luca, M., 2014. Concise review: Hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine: Hurdles in LSCD Regenerative medicine. *Stem Cells* 32: 26–34.
- Pellegrini, G., Traverso, CE., Franzi, AT., Zingirian, M., Cancedda, R., De Luca, M., 1997. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *The Lancet* 349: 990–3.
- Qi, Y., Jiang, D., Sindrilaru, A., Stegemann, A., Schatz, A., Treiber, N., Rojewski, M. et al., 2014. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 134 : 526–37.
- Rama, P., Matuska, S., Paganoni, G., Spinelli, A., De Luca, M., Pellegrini, G., 2010. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *New England Journal of Medicine* 363: 147–55.
- Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, EWF., Soeiro, I., Lombardi, G., Dazzi, F., 2007. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83: 71–6.
- Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., Ringdén, O., 2007. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 65: 336–43.
- Reinshagen, H., Auw-Haedrich, Sorg, RV., Boehringer, D., Eberwein, P., Schwartzkopff, Sundmacher, R., Reinhard, T., 2011. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmologica* 89: 741–8.
- Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L’huillie, A., Zhang, J. et al., 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression". *Stem Cells* 27: 1954–62.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, AI., Zhao, C., Shi, Y., 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2: 141–50.
- Rodriguez, AM., Elabd, C., Amri, EZ., Ailhaud, G., Dani, C., 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87: 125–8.
- Rohaina, CM., Then, KY., Hwei Ng, Am., Halim, HWWA., Zahidin, AZM., Saim, A., Idrus, RBH., 2014. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Translational Research* 163: 200–10.
- Rosado, MM., Bernardo, ME., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S., Cascioli, S. et al., 2015. Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells and Development* 24: 93–103.
- Sangwan, VS., Basu, S., Vemuganti, GK., Sejal, K., Subramaniam, SV., Bandyopadhyay, S., Krishnaiah, S., Gaddipati, S., Tiwari, S., Balasubramanian, D., 2011. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: A 10-year study. *British Journal of Ophthalmology* 95: 1525–9.
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, S., Shimizu, H., 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology* 180: 2581–7.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, O., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., Ozawa, K., 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109: 228–34.

- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C. et al., 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells". *Stem Cells* 26: 212–22.
- Sharpe, JR., Daya, SM., Dimitriadi, M., Martin, R., James, SE., 2007. Survival of cultured allogeneic limbal epithelial cells following corneal repair. *Tissue Engineering* 13: 123–32.
- Sirc J, Kubinová, Hobzova, Stranska, Kozlik, Bosakova, Marekova, Holan V, Sykova E, Michalek. 2012. Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *International Journal of Nanomedicine*: 5315-25.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24: 74–85.
- Spaggiari, GM., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Moretta, L., 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 113: 6576–83.
- Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P., Holan, V., 2012. The Role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells and Development* 21: 901–10.
- Swift, GJ., Aggarwal, RK., Davis, GJ., Coster, DJ., Williams, KA., 1996. Survival of rabbit limbal stem cell allografts. *Transplantation* 62: 568–74.
- Syed-Picard, FN., Du, Y., Lathrop, KL., Mann, MM., Funderburgh, ML., Funderburgh, JL., 2015. Dental pulp stem cells: A new cellular resource for corneal stromal regeneration. *Stem Cells Translational Medicine* 4: 276–85.
- Titiyal, JS., Sharma, N., Agarwal, AK., Prakash, G., Tandon, R., Vajpayee, R., 2015. Live related versus cadaveric limbal allograft in limbal stem cell deficiency. *Ocular Immunology & Inflammation* 23: 232–9.
- Trosan, P., Svobodova, E., Chudickova, M., Krulova, M., Zajicova, A., Holan, V., 2012. The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process. *Stem Cells and Development* 21: 3341-50.
- Waterman, RS., Tomchuck, SL., Henkle, SL., Betancourt, AM., 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5: e10088.
- Wiemer, AJ., Hegde, S., Gumperz, JE., Huttenlocher, A., 2011. A live imaging cell motility screen identifies prostaglandin E2 as a T cell stop signal antagonist. *The Journal of Immunology* 187: 3663–70.
- Yao, L., Li, Z., Su, W., Li, Y., Lin, M., Zhang, W., Liu, Y., Wan, Q., Liang, D., 2012. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 7: e30842.
- Yoon, BS., Moon, JH., Jun, EK., Kim, J., Maeng, I., Kim, JS., Lee, JH. et al., 2010. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 19: 887–902.
- Zajicova, A., Pokorna, K., Lencova, A., Krulova, M., Svobodova, E., Kubinova, S., Sykova, E., et al. 2010. Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds. *Cell Transplantation* 19: 1281–90.
- Zhang, B., Liu, R., Shi, D., Liu, X., Chen, X., Dou, X., Zhu, X. et al., 2009. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood* 113: 46–57.