

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kristýna Černá**

Antimikrobiální vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk

Antimicrobial properties of mesenchymal stem cells

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Michaela Hájková, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, 7. 5. 2018

Podpis:

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Michaele Hájkové, Ph.D. za nespočet rad, vstřícnost a trpělivost. Zároveň chci poděkovat rodině a přátelům za rady a podporu nejenom při psaní bakalářské práce, ale i v průběhu celého studia.

## Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs, mesenchymal stem cells) byly poprvé izolovány z kostní dřeně. Od té doby se izolovaly téměř za všech tkání těla. MSCs jsou multipotentní buňky s mnoha vlastnostmi, mezi které patří sebeobnovení, diferenciace do buněk všech tří zárodečných linií, trofické a imunomodulační schopnosti, specifická migrace do místa poranění a nedávno objevené antimikrobiální vlastnosti. Díky těmto vlastnostem jsou dobrými kandidáty pro buněčnou terapii, protože mohou být použity v léčbě mnoha onemocnění včetně bakteriálních infekcí. Tato práce přináší přehled o všech objevených antimikrobiálních vlastnostech MSCs. Je primárně zaměřena na jejich přímý a nepřímý antimikrobiální efekt. Přímý efekt zahrnuje sekreci antimikrobiálních látek a nepřímý efekt zahrnuje působení na aktivitu a funkce makrofágů a neutrofilů. Samostatnou kapitolu tvoří extracelulární váčky uvolněné MSCs, protože mohou mít jak přímý, tak nepřímý antimikrobiální efekt.

**Klíčová slova:** mezenchymální kmenové buňky, antimikrobiální efekt, bakterie, antimikrobní peptidy

## Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) were first isolated from bone marrow. Since that they were isolated from almost every tissue in the body. MSCs are multipotent cells with many properties including self-renewal, differentiation into the cells of all three germ lines, trophic and immunomodulatory abilities, specific migration to the site of injury and recently discovered antimicrobial properties. These properties make them a good candidate for cell therapy because they can be used in treatment of many diseases including bacterial infections. This thesis brings a summary of all discovered antimicrobial properties of MSCs. It is primarily focused on their direct and indirect antimicrobial effect. The direct effect is mediated by a secretion of antimicrobial substances and the indirect effect includes an impact on the activity and functions of macrophages and neutrophils. Extracellular vesicles derived from MSCs constitute separate chapter because they can have both direct and indirect antimicrobial effect.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, antibacterial effect, bacteria, antimicrobial peptides

# Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	9
2. Mezenchymální kmenové buňky	10
3. Vliv MSCs na buňky imunitního systému	11
3.1. MSCs v nespecifické imunitě	11
3.2. MSCs ve specifické imunitě	13
4. Další vlastnosti MSCs	14
5. Antimikrobiální vlastnosti MSCs	16
5.1 Přímé antimikrobiální působení MSCs	18
5.1.1 Antimikrobiální peptidy	18
5.1.1.1 Katelicidiny	18
5.1.1.2 Lipocaliny	19
5.1.1.3 Defensiny	20
5.1.1.4 Hepsidin	21
5.1.2 Antimikrobiální působeníIDO	21
5.2. Nepřímé antimikrobiální působení MSCs	23
5.2.1 Efekt MSCs na makrofágy/ monocyty	23
5.2.2 Efekt MSCs na neutrofilny	24
6. MSCs a extracelulární váčky	26
7. Závěr	28
8. Použité zdroje	29

## Seznam použitých zkratek

AMPs	antimicrobial peptides, antimikrobiální peptidy
BAL	bronchoalveolar lavage fluid, bronchoalveolární výplachová tekutina
BMP6	bone morphogenetic protein 6, kostní morfogenetický protein 6
Cats	cathelicidins, katelicidiny
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
CFU	colony forming unit, jednotka tvořící kolonii
COX2	cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2
DCs	dendritic cells, dendritická buňky
Defs	defensines, defensiny
EVs	extracellular vesicles, extracelulární váčky
Fas-L	Fas ligand
G- bakterie	gram negative bacteria, gram negativní bakterie
G+ bakterie	gram positive bacteria, gram pozitivní bakterie
Hcn	hepcidin
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA	human leucocyte antigen, lidský leukocytární antigen
hMSCs	human mesenchymal stem cells, lidské mesenchymální kmenové buňky
HO-1	heme oxygenase-1, hemová oxygenáza-1
IDO	indolamine 2,3-dioxygenase, indolamin 2,3-dioxygenáza
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
Ig	immunoglobulin, imunoglobulin
IL	interleukin
KGF	keratinocyte growth factor, růstový faktor keratinocytů
Lcn 2	lipocalin 2
Lcns	lipocalins, lipocaliny
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
MenSCs	menstrual fluid mesenchymal stem cells, mesenchymální kmenové buňky z menstruační tekutiny

MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
miRNA	microRNA, mikroRNA
MMPs	matrix metallo-proteases, matrixové metallo-proteázy
MMVs	microvesicles derived from mesenchymal stem cells, mikrovezikuly uvolněné mesenchymálními kmenovými buňkami
MSCs	mesenchymal stem cells, mesenchymální kmenové buňky
MVs	microvesicles, mikrovezikuly
NK	natural killer cells, NK buňky
NLR	NOD-like receptors, NOD-like receptory
NO	nitric oxide, oxid dusnatý
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PD-1	programmed death-1, programovaná smrt-1
PD-L1/2	programmed death ligand 1/2, ligand programované buněčné smrti 1/2
PGE2	prostaglandine 2, prostaglandin 2
ROS	reactive oxygen species, kyslíkové radikály
Tc	cytotoxic T-lymphocyte, cytotoxické T-lymfocyty
TCR	T-cell receptors, T-buněčné receptory
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$ , transformující růstový faktor $\beta$
Th	helper T-lymphocyte, pomocné T-lymfocyty
TLR	toll like receptors, toll like receptory
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$ , faktor nádorové nekrózy $\alpha$
Treg	regulatory T-lymphocyte, regulační T-lymfocyty
$\beta$ D	$\beta$ -defensins, $\beta$ -defensiny

# 1. Úvod

O mezechymálních kmenových buňkách (MSCs, mesenchymal stem cells) se poprvé zmínil ve své studii Alexander Friedenstein (Friedenstein et al., 1966).

Od té doby se stále více studií zabývá jejich ojedinělými schopnostmi a vlastnostmi. Mezi ně patří schopnost diferenciaci do tří zárodečných linií – mezodermu, ektodermu a endodermu, migrace v organismu do místa infekce, imunomodulace a další vlastnosti, do kterých lze zařadit i antimikrobiální.

První zmínka o antimikrobiálních vlastnostech MSCs se objevila asi před 9 lety (Gonzalez-Rey et al., 2009, Mei et al., 2010, Nemeth et al., 2009). Od té doby se biologický a klinický zájem začal věnovat také těmto unikátním vlastnostem, díky kterým by MSCs mohly nahradit léčbu antibiotiky, které se dlouhodobě potýkají s rezistencí bakterií.

Tato práce se věnuje představení jednotlivých antimikrobiálních vlastností MSCs. První kapitola představuje MSCs a jejich definování dané Mezinárodní společností pro buněčnou terapii. Druhá kapitola se věnuje jejich působení na buňky nespecifické a specifické imunity. Tímto působením mohou ovlivnit i imunitní odpověď organismu, což se může projevit na regulaci antimikrobiálních procesů. Třetí kapitola představuje antimikrobiální vlastnosti. Ty se dále rozdělují na přímé a nepřímé antimikrobiální působení MSCs. Obě působení jsou důležitá pro zlikvidování bakterií. Do přímého antimikrobiálního působení je zařazena sekrece antimikrobiálních látek jako jsou antimikrobiální peptidy a indolamin 2,3-dioxygenáza. Do nepřímého antimikrobiálního působení je zařazen vliv MSCs na makrofágy a neutrofile, který má za následek zvýšení fagocytární aktivity a následné likvidování bakterií. Extracelulárním váčkům uvolňovaným MSCs se věnuje poslední kapitola. Ty se mohou zařadit jak do přímého, tak do nepřímého antimikrobiálního působení. Mohou totiž obsahovat antimikrobiální látky, ale i ovlivňovat buňky nespecifické imunity.

## 2. Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs, mesenchymal stem cells) byly objeveny ve 20. století Alexandrem Friedensteinem (Friedenstein et al., 1966). Poprvé byly tyto buňky izolovány z kostní dřeně. Postupně byly MSCs izolovány téměř ze všech lidských tkání, a to nejenom z fetální, ale i z dospělé tkáně. Úspěšně se lidské mezenchymální kmenové buňky (hMSCs, human mesenchymal stem cells) izolovaly z placenty, menstruační krve, dentální tkáně, slinné žlázy, kůže, předkožky, tukové tkáně atd. Díky své schopnosti diferenciaci ve specifické buňky mezodermu, byly pojmenované právě jako mezenchymální kmenové buňky. Tyto kmenové buňky jsou multipotentní se schopností sebeobnovení. Dnes je prokázáno, že hMSCs se mohou diferencovat na buňky všech třech zárodečných linií – ektodermu, mezodermu a endodermu. MSCs se mohou diferencovat např. v nervové buňky (ektoderm), osteoblasty (mezoderm) a hepatocyty (endoderm) (Ullah et al., 2015).

Definování charakteristik MSCs z různých tkání bylo rozdílné napříč výzkumnými týmy, přesto se objevily podobné vlastnosti MSCs. Z tohoto důvodu vydala Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii doporučené ustanovení s minimálními kritérii pro definici hMSCs. Tato kritéria obsahují tři dobře prozkoumané vlastnosti hMSCs – adherenci k plastu, expresi specifických povrchových antigenů a multipotentní potenciál. Zaprvé, hMSCs vykazují ve standardních kultivačních podmínkách adherenci k plastu. Zadruhé, hMSCs by měly mít na svém povrchu specifické antigeny – diferenciační antigen (CD, cluster of differentiation)105 (endoglin), CD73 (ekto-5'-nukleotidáza), CD90 (Thy-1). Proto se dají navrhnout jako jejich markery. Zároveň by měla scházet exprese antigenů hematopoiетických buněk - CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 a lidský leukocytární antigen (HLA, Human Leucocyte Antigen) II. třídy. Zatřetí, *in vitro* se hMSCs dokážou diferencovat na osteoblasty, adipocyty a chondroblasty. Pro dokázání diferenciaci MSC do těchto tří linií buněk za standardních kultivačních podmínek se používá specifické barvení buněk. Alizarin Red nebo von Kossa barvení dokazuje diferenciaci v osteoblasty, barvení Oil Red O dokazuje diferenciaci v adipocyty a imunohistochemikální barvení kolagenu typu II. nebo Alcian blue dokazuje diferenciaci v chondroblasty. Tato uvedená minimální kritéria se v budoucnu mohou změnit objevem nových markerů a vlastností MSC (Dominici et al., 2006).

Jedním z hlavních problémů je získání dostatečného množství MSCs při kultivaci. Protože při dlouhodobé kultivaci a zvyšujícím se pasážování buněk ztrácí MSCs své jedinečné vlastnosti a zvyšuje se pravděpodobnost maligní transformace. Za tímto stojí stárnutí buněk, při které dochází ke snížení aktivity telomerázy (Ullah et al., 2015, Gu et al., 2016). I přes to se zvyšuje zájem biologického a klinického využití MSCs (Dominici et al., 2006).

### 3. Vliv MSCs na buňky imunitního systému

Kromě vlastností multipotence a sebeobnovení mají MSCs imunomodulační vlastnosti, kterými efektivně ovlivňují buňky nespecifické i specifické imunity. Přičemž důležitou roli hrají jak solubilní molekuly, jako je např. prostaglandin 2 (PGE<sub>2</sub>, prostaglandin 2), oxid dusnatý (NO, nitric oxide), indoleamine 2,3-dioxygenáza (IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase), interleukin (IL, interleukine) 6, růstový faktor hepatocytů (HGF, hepatocyte growth factor), tak povrchové markery CD54, ligand programované buněčné smrti 1/2 (PD-L1/2, programmed death ligand 1/2) a Fas ligand (Fas-L) (Uccelli et al., 2008, Di Trapani et al., 2016, Kol et al., 2014).

#### 3.1. MSCs v nespecifické imunitě

Makrofágy jsou speciální buňky, které pomocí fagocytózy pohlcují mrtvé buňky a různé mikroby. Makrofágy, především fenotyp M1, také produkují prozánětlivé cytokiny a molekuly NO. Makrofágy se mohou za určitých podmínek jako je přítomnost IL4 a IL-13 přeměnit na fenotyp M1 (Glenn and Whartenby, 2014). Pro polarizaci v M2 makrofágy je typické vyšší množství IL-10 a nízká hladina IL-12 a faktoru nekrózy nádorů  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ) (Spaggiari and Moretta, 2013). Bylo dokázáno, že MSCs migrující do oblasti zranění iniciují polarizaci makrofágů v M2 podporující reparaci zranění a zároveň potlačují M1 makrofágy (Glenn and Whartenby, 2014, Spaggiari and Moretta, 2013, Hajkova et al., 2017). Iniciace polarizace v M2 makrofágy je způsobena produkováním PGE<sub>2</sub> MSCs, který snižuje expresi TNF $\alpha$  a IL-6 makrofágy. Zároveň se prostřednictvím PGE<sub>2</sub> indukuje exprese CD206 u makrofágů, což je molekula

charakteristická pro regulační M2 fenotyp. (Glenn and Whartenby, 2014, Kim and Hematti, 2009).

Dalšími buňkami nespecifické imunity jsou neutrofilů. Jsou schopny se mobilizovat a odstranit nechtěné mikroorganismy v těle. Po rozpoznání mikrobiálních molekul zahájí proces respiračního vzplanutí, které spočívá v uvolnění obrovského množství mikrobicidních oxidativních produktů a je spojeno s apoptózou neutrofilů. Působení MSCs způsobí utlumení respiračního vzplanutí a oddalují apoptózu neutrofilů prostřednictvím IL-6 (Uccelli et al., 2008, Glenn and Whartenby, 2014, Raffaghello et al., 2008).

NK buňky (NK, natural killer cells) jsou efektorové buňky nespecifické imunity jejichž hlavní úlohou je obrana proti virovým infekcím a nádorovým buňkám. MSCs inhibují proliferaci a cytotoxickou aktivitu NK buněk (Uccelli et al., 2008). Jako inhibitory byly prokázányIDO a PGE2 (Spaggiari et al., 2006, Spaggiari et al., 2008). MSCs snižují expresi receptorů NK buněk – NKG2D, NKp44 a NKp30 (Glenn and Whartenby, 2014, Spaggiari et al., 2008). NK kultivované s IL-2 a IL-15 proliferují a vykazují silnou cytotoxickou aktivitu. Naopak NK inkubované společně s MSCs nevykazují proliferaci. V závislosti na aktivaci mají MSCs také schopnost regulovat produkci interferonu  $\gamma$  (INF $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ) a snižuje množství TNF $\alpha$  (Uccelli et al., 2008, Spaggiari et al., 2006, Najjar et al., 2018).

Žírné buňky se podílejí na alergické odezvě těla. Produkují prozánětlivé cytokiny a obsahují granule s histaminem. MSCs snižují produkci PGE2 schopnosti žírných buněk degranulovat a produkovat TNF $\alpha$  (Brown et al., 2011).

Dendritické buňky (DCs, dendritic cells) představují propojení nespecifické a specifické imunity. Jejich vlastnosti zahrnují produkci cytokinů a prezentaci antigenů naivním T buňkám. MSCs mají schopnost inhibovat diferenciaci DCs a indukovat regulační fenotyp charakterizovaný sníženou expresí hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, major histocompatibility complex) I. třídy, MHC II. třídy a ostatních markerů buněčného povrchu DCs – CD83, CD86, CD80 a CD40 (Glenn and Whartenby, 2014, Uccelli et al., 2008). MSCs taktéž inhibují produkci IL-12 DCs a mění endocytózu a zpracování antigenů (Jiang et al., 2005).

### 3.2. MSCs ve specifické imunitě

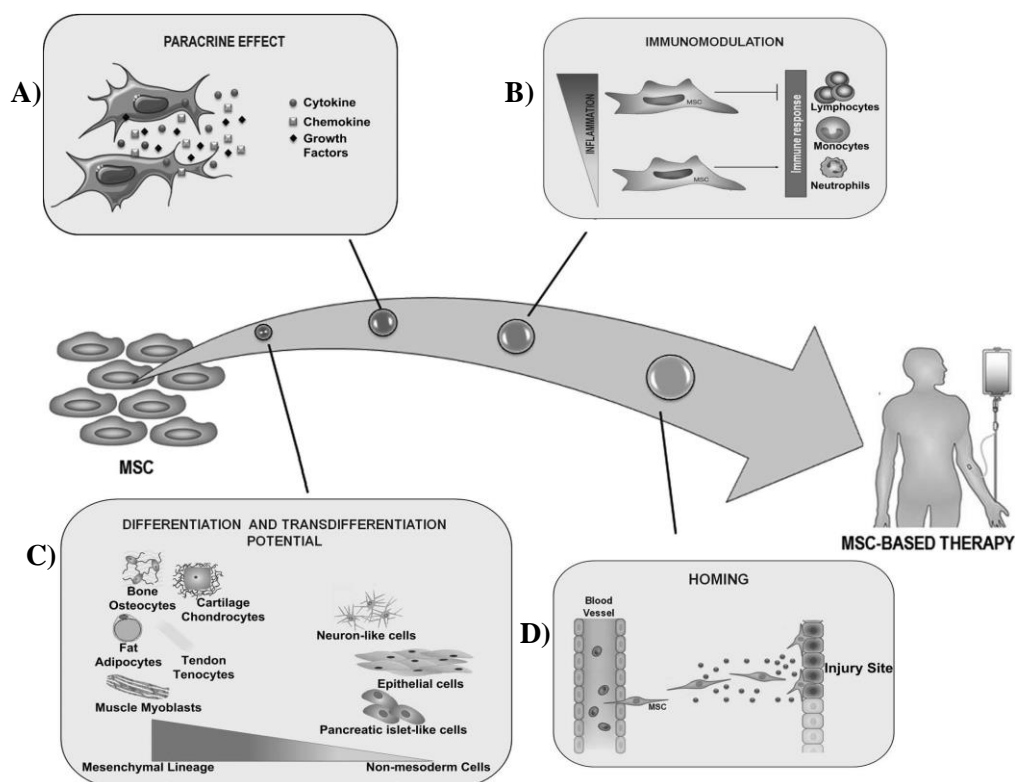
T lymfocyty jsou součástí specifické imunity, které regulují imunitní odpověď a jsou rozděleny do několika populací. Po aktivaci přes T-buněčné receptory (TCR, T-cells receptor) proliferují a diferencují se na efektorové pomocné (Th, helper T-lymphocyte) a cytotoxické T-lymfocyty (Tc, cytotoxic T-lyphocyte). Hlavními populacemi jsou Th1 buňky produkující  $IFN\gamma$ , Th2 buňky produkující IL-4 a IL-13. Dále regulační T-lymfocyty (Treg, regulatory T- lymphocyte) produkující IL-10, Th17 buňky produkující IL-17 a Tc lymfocyty, které pomocí cytotoxických granulí odstraňují infikované a rakovinné buňky (Glenn and Whartenby, 2014). MSCs inhibují proliferaci T buněk mezi fázemi  $G_0$  a  $G_1$  buněčného cyklu (Glennie et al., 2005). MSCs ovlivňují T lymfocyty především produkcí NO, PGE2, HGF a  $TGF\beta$  (Glenn and Whartenby, 2014, Ucceli et al., 2008). Snižují expresi  $IFN\gamma$  Th1 buňkami a IL-17 Th17 buňkami. MSCs zvyšují produkci IL-4 Th2 buňkami, IL-10 a transformující růstový faktor  $\beta$  ( $TGF\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ) Treg buňkami a potlačují správnou funkci cytotoxických T lymfocytů. (Svobodova et al., 2012, Mohammadzadeh et al., 2014). Dále jsou MSCs schopny inhibovat proliferaci T buněk aktivací receptoru programované smrti-1 (PD-1, programmed death-1) (Augello et al., 2005).

Dalšími buňkami specifické imunity jsou B lymfocyty, které produkují protilátky, mají roli v přímé neutralizaci patogenů, podporují fagocytózu a aktivaci ostatních buněk imunitního systému. MSCs inhibují proliferaci B buněk, konkrétně na přelomu fází  $G_0$  a  $G_1$  buněčného cyklu a nezpůsobují jejich apoptózu. MSCs v kultuře s B buňkami snižují produkci imunoglobulinu (Ig, immunoglobulin) M, IgG a IgA a snižují expresi CXCR4, CXCR5 a CCR7 a dále chemotaxi k CXCL12 a CXCL13 B buněk (Corcione et al., 2006, Glenn and Whartenby, 2014). Jedním ze zprostředkovatelů inhibice B buněk MSCs je aktivace cesty PD-1 (Augello et al., 2005). Ale zároveň různé studie vykazují odlišné výsledky, což může být dáno odlišným původem B buněk, se kterými se pracovalo, a především poměrem MSCs: B buňky použitým při kultivaci a inkubaci (Franquesa et al., 2012).

#### 4. Další vlastnosti MSCs

Kromě imunomodulačních a diferenciacních vlastností mají MSCs i další funkce v organismu (obr. 1). Nacházejí se téměř po celém těle, a to strategicky v perivaskulárních prostorech. Jsou schopné migrovat do zdravých i poraněných tkání, kde se podílejí na potlačování zánětu a hojení zranění (Glenn and Whartenby, 2014). Proces migrace na místo zranění se nazývá homing. Právě homing MSCs je jednou z výzev pro studie zabývajících se jejich využitím v buněčné terapii. Mezi faktory, které ovlivňují správný homing MSCs, patří např. počet buněk, cytokinové prostředí a exprese matrixové metallo-proteázy (MMPs, matrix metallo-proteases). Doposud však není přesný mechanismus homingu MSCs zcela objasněný (Ullah et al., 2015).

Z klinického hlediska je velmi zajímavé to, že MSCs jsou hypoimmunogenní – vyznačují se nízkou expresí MHC I. a chybějící expresí MHC II., CD80, CD40 a CD86. Díky tomu jsou chráněny před lýzou způsobenou NK i Tc buňkami (Ullah et al., 2015).



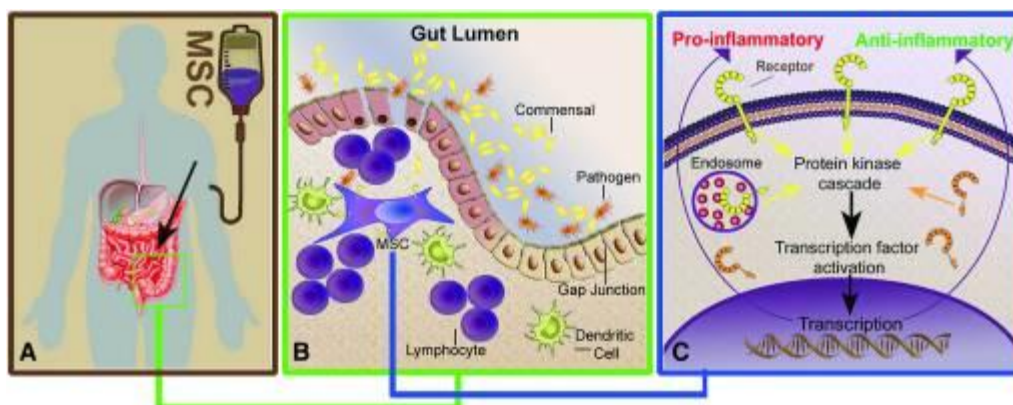
**Obrázek 1 – biologické funkce MSCs v lidském těle.**

MSCs mohou působit parakinně – sekrecí celé řady látek jako jsou IDO, PGE2, růstových faktorů a dalších, kterými ovlivňují ostatní buňky v organismu (A). Významné jsou imunomodulační vlastnosti - MSCs ovlivňující buňky specifické i nespecifické imunity a směřují imunitní odpověď z prozánětlivé na protizánětlivou (B). Mezi další důležité vlastnosti MSCs patří jejich diferenciaci na adipocyty, chondroblasty a osteoblasty, ale zároveň se MSCs mohou diferenciovat na buňky ektodermu a endodermu (C). MSCs dokážou migrovat na místa infekce, poškození nebo zánětu v organismu a tam přispívat k jejímu odstranění (D). Zkratky: IDO (indolamin 2,3-dioxygenáza, indoleamine 2,3-dioxygenase), PGE2 (prostaglandin E2, prostaglandine E2) (upraveno a převzato z Squillaro et al., 2016).

Imunomodulační, diferenciací i migrační vlastnosti MSCs jsou předmětem mnoha studií. Mezi další vlastnosti MSCs můžeme zařadit právě antimikrobiální vlastnosti MSCs, které nejsou zdaleka tak prozkoumané, jako například vliv MSCs na buňky imunitního systému. První zmínky o jejich antimikrobiálních vlastnostech se objevily teprve zhruba před 9 lety (Gonzalez-Rey et al., 2009, Krasnodembskaya et al., 2010, Nemeth et al., 2009).

## 5. Antimikrobiální vlastnosti MSCs

MSCs se podílejí na antimikrobiální odpovědi v organismu, ale i samy o sobě mají antimikrobiální vlastnosti. Jak již bylo zmíněno v úvodních kapitolách, působení MSCs je velice komplexní, a navíc se ukazuje, že závisí na mikroprostředí, ve kterém se MSCs nachází. Kromě receptorů pro cytokiny a chemokiny totiž exprimují také toll like receptory (TLR, toll like receptors) a NOD-like receptory (NLR, NOD-like receptors), což jim umožňuje rozpoznávat a reagovat na různé mikroorganismy (obr. 2) (Pevsner-Fischer et al., 2007, Kol et al., 2014). Pokud je přítomno větší množství mikroorganismů a zároveň ještě nízké hladiny prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$  a INF $\gamma$ , dochází k aktivaci MSCs prostřednictvím LPS a dalších molekul, které se váží na TLR-4, což vede k indukci prozánětlivého fenotypu M1. Takto ovlivněné buňky v časných fázích zánětu zesilují imunitní odpověď tím, že podporují funkce neutrofilů i makrofágů a zmenšuje se jejich schopnost potlačovat aktivaci T lymfocytů. K jejich indukci na hojivý, protizánětlivý fenotyp M2 dochází po stimulaci vyššími hladinami TNF $\alpha$  a INF $\gamma$  a po aktivaci přes TLR-3 (Gazdic et al., 2015, Waterman et al., 2010). Na výsledné polarizaci MSCs se však podílí i další signální molekuly a jejich kombinace. Aktivace přes TLR-3 může v závislosti na ligandu vyvolat jak prozánětlivý fenotyp MSCs (Cassatella et al., 2011), tak protizánětlivý (Zhao et al., 2014). Na základě složení signálů z okolí se mohou měnit také migrační schopnosti. Kol et al. zjistili, že po interakci MSCs s probiotickou bakterií *Lactobacillus acidophilus* se jejich migrační vlastnosti nemění, ale kontakt s invazní bakterií *Salmonella typhimurium* tyto schopnosti snižuje. Ve stejné studii bylo také prokázáno, že po interakci se *Salmonella typhimurium* dochází k indukci exprese IL-6, IL-8, HGF, cyklooxygenázy 2 (COX2, cyclooxygenase 2), CD54 a zvýšené produkci IL-6, IL-8 a PGE2. MSCs tudíž při kontaktu s invazivní bakterií zvýší své imunomodulační a antimikrobiální schopnosti (Kol et al., 2014). Bylo prokázáno, že antimikrobiální vlastnosti MSCs je možné modulovat i dalšími faktory, které zvyšují aktivitu MSCs. Mezi tyto faktory patří například TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , UV záření, aktin B nebo kostní morfogenetický protein 6 (BMP6, bone morphogenetic protein 6) (Alcayaga-Miranda et al., 2017).



**Obrázek 2 – závislost aktivity MSCs na mikroprostředí.**

MSCs podané např. pacientovi s poraněním střeva doputují k místu zranění ve střevě (A). Na svém povrchu interagují pomocí TLR, NLR a dalších receptorů s okolními molekulami a buňkami. Záleží na tom, od koho MSCs přijme signál – jestli např. od komezální nebo od invazivní bakterie (B). Různé signály mohou nastartovat různé signalizační cesty a transkripční aktivitu MSCs, které mohou vést buď k prozánětlivé, nebo protizánětlivé odpovědi MSCs. Zkratky: NLR (NOD-like receptory, NOD-like receptors), TLR (toll like receptory, toll like receptors) (převzato z Kol et al., 2014).

MSCs mají tedy mnoho funkcí, které lze zařadit mezi antimikrobiální vlastnosti. S jejich antimikrobiálními vlastnostmi souvisí sekrece látek, která se řadí mezi přímé antimikrobiální působení MSCs, i imunomodulace ostatních buněk imunitního systému, která se řadí mezi nepřímé antimikrobiální působení MSCs. MSCs mohou navíc uvolňovat extracelulární váčky, které mají srovnatelný antimikrobiální efekt jako MSCs samotné. Ukazuje se, že mají jak přímé, tak nepřímé antimikrobiální působení. Proto by tyto extracelulární váčky mohly být dalším potencionálním terapeutickým prostředkem (obr. 3) (Monsel et al., 2015, Merino-González et al., 2016). Vlivem MSCs na zlikvidování bakterií se zabývají studie zmíněné v následujících kapitolách. Kromě *in vitro* podmínek využívají především modely sepsy a cystické fibrózy.

## 5.1 Přímé antimikrobiální působení MSCs

### 5.1.1 Antimikrobiální peptidy

Čím dál tím více bakteriálních kmenů je rezistentní vůči antibiotikům, mnoho studií se proto zaměřuje na vývoj nových antibiotik. Antimikrobiální peptidy (AMPs, antimicrobial peptides) jsou součástí přirozené imunity člověka a oproti antibiotikům se zaměřují na jiné molekulární a strukturální cíle bakterií. Proto jsou dobrými kandidáty pro vývoj léků. AMPs produkují různé buňky těla, zahrnující epitelální, kožní, buňky imunitního systému atd. Některé AMPs jsou produkovány i MSCs (Alcayaga-Miranda et al., 2017, Pinheiro da Silva and Machado, 2012). Patří mezi ně: katelicidiny, lipocaliny, defensiny a hepcidin.

#### 5.1.1.1 Katelicidiny

Katelicidiny (Cats, cathelicidins) mají kromě antimikrobiálních vlastností i protirakovinné, chemotaktické a angiogenní schopnosti. U lidí MSCs produkují katelicidin LL-37. Ten se nachází také v buňkách plasmy, kostní dřeni, dýchacím traktu a kůži. Jejich expresi indukuje kromě TLR a cytokinů i vitamín D. Jako AMPs brání růstu a množení jak gram negativních bakterií (G- bakterie, gram negative bacteria), tak gram pozitivních bakterií (G+ bakterie, gram positive bacteria) (Alcayaga-Miranda et al., 2015, Mattar et al., 2016).

Krasnodembskaya et al. se zaměřili na možnou sekreci lidského Cat LL-37 MSCs. Zároveň se snažili ověřit, jestli právě sekrece LL-37 přispívá k antimikrobiálním vlastnostem MSCs. Ke studii použili infekční G- bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) a G+ bakterie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). MSCs z kostní dřene specificky stimulovali pomocí *E. coli*. Stimulované MSCs byly *in vitro* infikované 300 jednotkami tvořícími kolonii (CFU, colony forming unit) *E. coli* a po 6 hodinách byl vidět výrazný úbytek bakterií. Velmi obdobný efekt inhibice byl pozorován i u *P. aeruginosa* a *S. aureus*. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce ukázala zvýšení exprese LL-37 u stimulovaných MSCs. K prokázání, že LL-37 souvisí s antimikrobiálním efektem MSCs, byla do média se stimulovanými MSCs přidána navíc protilátka proti LL-37. Po 2 hodinách kultivace byly přidány bakterie buď *E. coli*, nebo *P. aeruginosa*. Přítomnost anti-LL-37 způsobila, že antimikrobiální efekt MSCs se

neprojevili ani proti jednomu kmenu bakterií. V další fázi studie byl k prokázání antimikrobiálního efektu LL-37 použit *in vivo* model. Myš byla infikována  $10^6$  CFU *E. coli*. Po 4 h od infikování bylo do myši intratracheálně aplikováno  $10^6$  MSCs. Po 18 hodinách byl počet bakterií výrazně redukován jak v plicních homogenátech, tak v bronchoalveolární výplachové tekutině (BAL, bronchoalveolar lavage fluid) myši. Pro důkaz, že MSCs jsou hlavními producenty LL-37 v BAL, byla použita kultivace společně s epiteliálními buňkami. Zde se ukázalo, že epiteliální buňky produkují malé množství LL-37 oproti MSCs. Tato studie zjišťovala ELISA testem i přítomnost jiných AMPs. Byla detekována nízká koncentrace  $\beta$ -defensinů ( $\beta$ D,  $\beta$  defensines) a lipocalin 2 (Lcn 2, lipocalin 2) (Krasnodembskaya et al., 2010).

Sutton et al. se zaměřili na studium působení LL-37 produkovaného MSCs, které aplikovali společně s antibiotikem geneticinem. Tato kombinace snížila bakteriální růst *P. aureginosa* a *S. aureus* více než samotné MSCs. Proto by v budoucnu MSCs v kombinaci s antibiotiky mohly představovat prostředek pro efektivnější a rychlejší snížení bakteriálního růstu v infikovaných jedincích (Sutton et al., 2016).

#### 5.1.1.2 Lipocaliny

Lipocaliny (Lcns, lipocalins) jsou malé AMPs. Bakteriální růst zastavují navázáním na siderofory. Siderofory jsou produkovány bakteriemi a při bakteriální infekci vycytávají v hostiteli železo a usnadňují jeho příjem bakterií (Berger et al., 2006). Kromě antimikrobiálních vlastností mají Lcns v buňkách i jiné funkce. Mezi ně patří ochrana před stresem a zvýšení jejich proliferace a exprese antioxidantů a růstových faktorů. MSCs konkrétně produkují Lcn 2. (Alcayaga-Miranda et al., 2017, Berger et al., 2006, Halabian et al., 2013).

Gupta et al. prokázali antimikrobiální efekt Lcn 2 produkovaného MSCs na myším modelu. Jako onemocnění použili bakteriální pneumonii způsobenou *E. coli*. Právě bakteriální pneumonie se řadí na přední příčky mezi onemocnění, která způsobují úmrtí po celém světě. MSCs byly intratracheálně aplikovány do myši, která byla 4 hodiny před jejich aplikací infikována *E. coli*. Vážnost pneumonie zjistili změřením přebytečné plicní vody. Ta byla velice rozdílná - u myši s MSCs byl objem výrazně menší než u myši s fibroblasty a fosfátovým pufrům (PBS, phosphate buffered saline). Po aplikování MSCs odebrali z myši BAL. Měřením BAL u myši s MSCs pomocí ELISA testu bylo dokázáno potlačení bakteriálního růstu. Ukázala se zvýšená produkce Lcn 2 o 56 % v BAL u myši

s MSCs oproti myším s PBS. V další fázi studie bylo zjištěno výrazné zvýšení produkce Lcn 2 MSCs po kultivaci MSCs společně s makrofágy stimulovanými LPS. Zvýšená produkce byla také po kultivaci s prozánětlivými cytokiny. Zjistili tedy že, *in vitro* MSCs dokážou produkovat dostatečné množství Lcn 2 jako odpověď na stimulaci pomocí LPS a TNF $\alpha$  (Gupta et al., 2012).

### 5.1.1.3 Defensiny

Defensiny (Defs, defensines) hrají důležitou roli v lidském imunitním systému. Jsou rozděleny do tří hlavních skupin, a to alfa, beta a théta. Podílejí se na nespecifické i specifické imunitě. Mezi hlavní AMPs v lidském těle patří  $\beta$ -defensinů ( $\beta$ D,  $\beta$ -defensines). Kromě antimikrobiálních vlastností mají i antivirové účinky. Sekrece  $\beta$ D je indukována mikroorganismy a prozánětlivými cytokiny. V těle  $\beta$ D produkují epitelální buňky, granulocyty i MSCs, MSCs konkrétně produkují  $\beta$ D-1,  $\beta$ D-2 a  $\beta$ D-3 (Mattar et al., 2016, Alcayaga-Miranda et al., 2017).

Sung et al. se zaměřili na sekreci  $\beta$ D-2 a jeho mechanismus působení vůči *E. coli*. *In vitro* bylo  $10^3$  CFU *E. coli* inkubováno 6 h společně s MSCs získanými z pupečnickové krve. Po 6 hodinách bylo pozorováno snížení bakteriálního růstu. K identifikaci genů, které jsou potřebné pro antimikrobiální efekt MSCs v kultuře byla použita metoda DNA čipů. Zjistili, že se zvýšila exprese 400 genů, které hrají roli v signalizaci, proliferaci i imunitní odpovědi. Mezi nimi byly i geny pro TLR2 a TLR4. Aby prokázali, že právě tyto TLR signalizační cesty mohou stimulovat a podílet se na antimikrobiálním efektu MSCs, použili antagonisty TLR-2 a TLR-4. *In vitro* byl potlačen antimikrobiální efekt MSCs jen v kultuře s TLR-4 antagonistou. Tudiž produkce  $\beta$ D-2 je zprostředkována přes TLR-4 signalizační cestu. Antimikrobiální efekt MSCs zprostředkovaný  $\beta$ D-2 byl prokázán i v *in vivo* modelu. Sung et. al. infikovali myši  $10^7$  CFU *E. coli*. Po 6 hodinách od infikování byly do myši intratracheálně aplikovány MSCs. Po 24 hodinách bylo změřeno množství  $\beta$ D-2 v izolované BAL myši. Prokázala se vyšší produkce  $\beta$ D-2. Tato práce byla zaměřena pouze na sekreci  $\beta$ D-2 (Sung et al., 2016). Produkci dalších AMPs MSCs, jako je LL-37 nebo Lcn 2 nevyvracela a jejich významem se zabývaly již zmíněné předchozí studie.

#### 5.1.1.4 Hecpidin

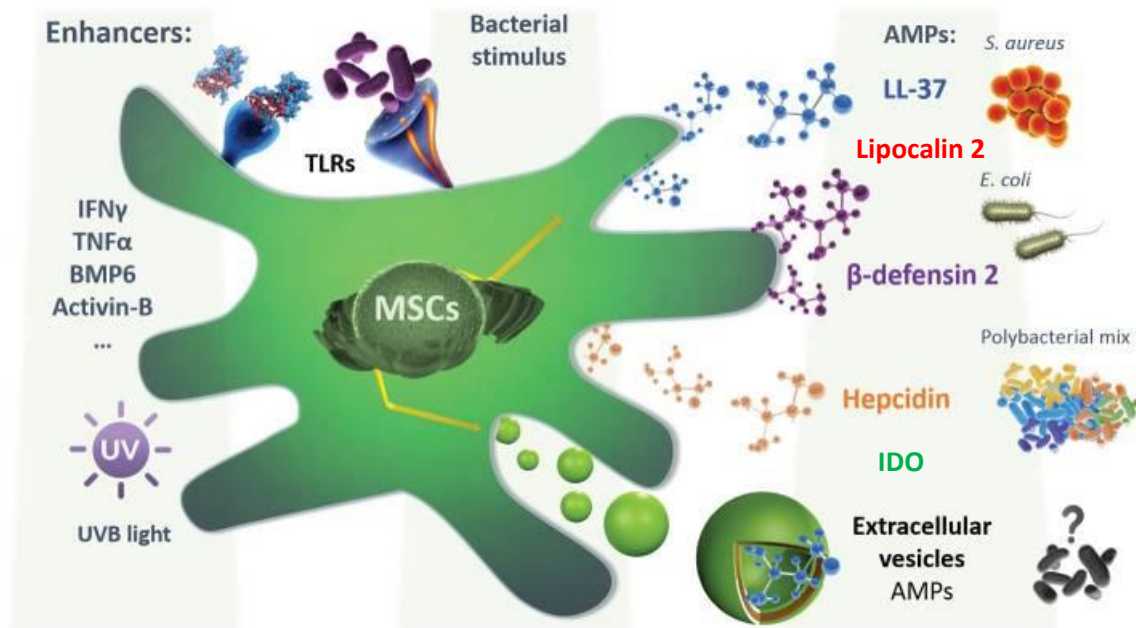
Hecpidin (Hcn, hepcidin) je hormon produkovaný játry. Funguje v imunitní odpovědi a udržení hladiny železa v lidském organismu, a to vazbou na ferroportin. Hcn patří mezi AMPs produkované MSCs (Nemeth et al., 2004, Sonnweber et al., 2014).

Alcaya-Miranda et al. inkubovali 6 hodin MSCs z menstruační tekutiny (MenSCs, menstrual fluid mesenchymal stem cells) společně s polybakteriální směsí. Ve vzorcích s nestimulovanými MenSCs i MenSCs, které byly předtím stimulované polybakteriální kulturou, se projevila inhibice bakteriálního růstu. Dále byla zjištěna nízká sekrece Hcn MenSCs a po stimulaci její mnohonásobné zvýšení. V *in vivo* modelu byly MenSCs schopné snížit úmrtnost myší. Dále porovnávali inhibici bakteriálního růstu ve vzorcích s antibiotiky nebo s MenSCs. Oba vzorky vykazovaly srovnatelné snížení bakteriálního růstu. Ve vzorku s kombinací antibiotika a MenSCs byl menší počet bakteriálních kolonií než ve vzorku s antibiotikem. Tudíž tato kombinace se jeví jako rychlejší a účinnější terapie než léčba pouhými antibiotiky (Alcayaga-Miranda et al., 2015).

#### 5.1.2 Antimikrobiální působeníIDO

Už byla přestavena sekrece různých AMPs jako přímého antimikrobiálního působení MSCs (obr. 3). Mezi přímé působení se řadí také sekrece enzymu IDO, který má jak antimikrobiální vlastnosti, tak i imunosupresivní vlastnosti.

Meisel et al. stimulovali hMSCs z kostní dřeně prozánětlivými cytokiny, jako jsou TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  a INF $\gamma$ . Tyto cytokiny zvýšily nebo dokonce indukovaly expresi IDO MSCs. Zjistili, že IDO produkovaná hMSCs snižuje bakteriální růst a inhibuje T buňky v počáteční fázi imunitní odpovědi na bakteriální infekci. Antimikrobiální efekt IDO je způsoben tím, že se prostřednictvím IDO katabolizací vyčerpá tryptofan, který je nezbytný pro bakteriální růst (Meisel et al., 2011).



**Obrázek 3 – stimuly MSCs a přímé antimikrobiální působení MSCs.**

Exprese a sekrece AMPs MSCs se dokáže zvýšit za pomoci stimulace bakteriálními molekulami přes TLR. Mezi další stimulační faktory patří  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , BMP6, aktivin B a UV záření. Po stimulaci se zvýší aktivita MSCs spojená s větší sekrecí AMPs. Zatím byla prokázána sekrece – katelicidinu LL-37,  $\beta$ -defensinu, hepcidinu a lipocalinu 2. Kromě sekrece AMPs dokážou MSCs produkovat také antimikrobiální IDO. MSCs jsou schopné uvolňovat extracelulární váčky, které mohou také obsahovat AMPs a tím se z části řadí k přímému antimikrobiálnímu působení MSCs i k nepřímému antimikrobiálnímu působení modulací makrofágů/monocytů a neutrofilů. Zkratky: AMPs (antimikrobiální proteiny, antimicrobials proteins), BMP6 (kostní morfogenetický protein 6, bone morphogenetic protein 6), IDO (indoleamine 2,3-dioxygenáza, indoleamine 2,3-dioxygenase),  $\text{INF}\gamma$  (interferon  $\gamma$ ),  $\text{TNF}\alpha$  (faktor nekrózy nádorů  $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ) (upraveno a převzato z Alcayaga-Miranda et al., 2017).

## 5.2. Nepřímé antimikrobiální působení MSCs

Kromě vlastní sekrece AMPs, přispívá k antimikrobiálním vlastnostem MSCs i jejich vliv na imunitní buňky jedince. Mechanismy regulace jednotlivých imunitních buněk byly popsány v úvodní kapitole. Následující kapitoly jsou věnovány ovlivňování antimikrobiálních vlastností buněk nespecifické imunity: monocytům/ makrofágům a neutrofilům.

### 5.2.1 Efekt MSCs na makrofágy/ monocyty

MSCs samy o sobě postrádají fagocytární aktivitu, ale mohou napomoci jejímu zvýšení u jiných buněk imunitního systému. Poukázaly na to studie při různých modelech sepse. Pro dané zvýšení jejich fagocytární aktivity je potřeba, aby byly MSCs aktivované např. bakteriálními molekulami. Aktivované MSCs přesněji regulují a repolarizují makrofágy nebo monocyty (Mei et al., 2010). Devaney et al. ve své studii zkoumali vliv MSCs na makrofágy a jejich fagocytózu při infekci *E. coli*. Použili MSCs izolované z kostní dřeně, které aplikovali intratracheálně nebo intravenózně do myši infikovaných *E. coli*. Prokázali, že po obou aplikacích MSCs se snížil bakteriální růst a množství alveolárního IL-6 a naopak se zvýšilo množství alveolárního IL-10, LL-37 a růstového faktoru keratinocytů (KGF, keratinocyte growth factor) (Devaney et al., 2015), který má také antimikrobiální vlastnosti (Monsel et al., 2015). Monocyty a makrofágy izolované ze zvířat, kterým byly aplikované MSCs, vykazovaly zvýšení počtu a zvýšenou fagocytózu v porovnání se zvířaty bez aplikovaných MSCs. Své výsledky ověřili v *in vitro* systému, kdy po přidání MSCs v kulturách *E. coli* a makrofágů pozorovali inhibici růstu bakterií, nárůstu počtu makrofágů i jejich fagocytózy (Devaney et al., 2015). K závěrům, že MSCs zvyšují fagocytózu bakterií makrofágy došli také Krasnodembskaya et al. Konkrétně prokázali, zvýšenou koncentraci anafylotoxinu C5a v myši s aplikovanými MSCs. Právě anafylotoxin C5a by měl mít vliv na expresi CD11b makrofágů a tím zvýšit jejich fagocytární aktivitu (Krasnodembskaya et al., 2012).

### 5.2.2 Efekt MSCs na neutrofilů

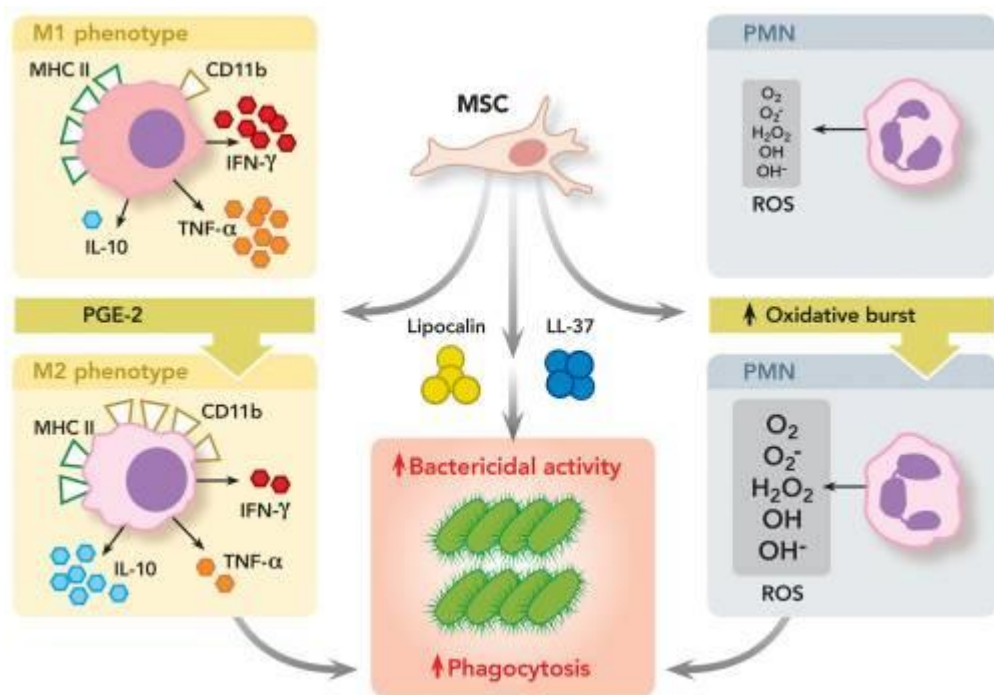
MSCs inhibují aktivitu neutrofilů, jak už bylo řečeno v kapitole o imunodulačních vlastnostech. Například Luo et al. použili myši modely se sepsí spojenou s akutním poškozením ledvin. Po aplikaci MSCs do myši si všimli snížené produkce IL-17, který se zdá jako jeden z mediátorů mobilizace neutrofilů. Tudíž se snížila i aktivace společně s fagocytózou neutrofilů (Luo et al., 2014). Na druhou stranu při bakteriální infekci mohou MSCs zvýšit jejich fagocytární aktivitu (Keane et al., 2017).

Ve studii Brandau et al. použili MSCs izolované z kostní dřeně, které stimulovali LPS. MSCs vykazovaly expresi TLR4 a produkovaly IL-6, IL-8 a faktor migrace makrofágů. Při kultivaci těchto MSCs s neutrofilů detekovali zvýšenou produkci chemokinu CCL4. Dále stimulované MSCs zvýšily ve vzorcích fagocytózu a migraci neutrofilů a indukovaly jejich respirační vzplanutí. Prokázali, že kromě z kostní dřeně se na antimikrobiálním efektu neutrofilů významně podílejí i MSCs izolované z jiných tkání, například z průšních žláz (Brandau et al., 2014). Johnson et al. také pozorovali stimulační vliv MSCs na neutrofilů. MSCs izolované z tukové tkáně aplikovali do myši infikované *S. aureus*. Zjistili, že MSCs se na zlikvidování bakterií podílí jak přímo produkcí AMPs, tak nepřímo zvyšováním fagocytózy u neutrofilů (obr.4) (Johnson et al., 2017).

V další studii chtěli Hall et al. zjistit roli hemové oxygenázy-1 (HO-1, heme oxygenase-1) při bakteriálních infekcích. Je známo, že MSCs používají HO-1 k imunomodulaci ostatních buněk. Vyizolovali peritoneální neutrofilů a MSCs z kostní dřeně wild type myši, která měla HO-1 a myši deficientní na HO-1. Zjistili, že v *in vitro* i v *in vivo* modelu zvyšují MSCs z obou myši fagocytózu neutrofilů, ale přínosnější a lepší efekt na likvidaci bakterií mají MSCs z wild type myši. (Hall et al., 2013).

V jiné studii Romier-Mourez et al. ukázali, že MSCs pravděpodobně ovlivňují, kromě makrofágů/monocytů a neutrofilů i antimikrobiální efekt dalších buněk nespecifické imunity. V *in vitro* modelu detekovali zvýšenou fagocytární aktivitu, migraci, počet a koncentraci chemokinů a cytokinů makrofágů a neutrofilů. Zároveň také, ale prokázali zvýšenou hladinu dalších cytokinů a chemokinů produkovaných DCs i NK (Romieu-Mourez et al., 2009). Dalším studiem, které se zaměřuje nejenom na obě populace (makrofágy a neutrofilů), ale i společným vztahem mezi nimi, se zabývali Németh et al. Zjistili, že MSCs, které aktivovali LPS nebo TNF $\alpha$ , sekretují PGE2 a

prostřednictvím něj regulují polarizaci makrofágů v M2 fenotyp. Zároveň tyto MSCs způsobily zvýšení množství IL-10 a snížení množství TNF $\alpha$  a IL-6 (obr. 4). Studie, ale také ukázala, že M2 makrofágy zabránily multiorgánovému poškození tím, že inhibovaly migraci neutrofilů do tkání, kde by způsobily oxidační poškození. Místo toho tyto neutrofilů zůstaly v krvi, kde účinně fagocytózou likvidovaly bakterie (Nemeth et al., 2009).



**Obrázek 4 – rozdíl mezi přímým a nepřímým antimikrobiálním působením MSCs.**

MSCs sekretují např. lipocalin a lidský katelicidin LL-37 a touto sekrecí přímo působí na zlikvidování bakterií. Nepřímé antimikrobiální působení MSCs je způsobeno vlivem MSCs na makrofágy/monocyty a neutrofilů. Existují dva fenotypy makrofágů - prozánětlivé M1 makrofágy, pro které je typická vysoká hladina TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  a nízká hladina IL-10, a protizánětlivé M2 makrofágy, pro které je typická vysoká hladina IL-10 a nízká hladina TNF $\alpha$  a INF $\gamma$ . MSCs způsobují polarizaci makrofágů v M2 makrofágy a tím zvyšují fagocytární aktivitu makrofágů spojenou s likvidací bakterií. MSCs mohou v případě bakteriální infekce zvýšit fagocytózu neutrofilů a indukovat respirační vzplanutí spojené s uvolněním ROS a tím zlikvidovat bakterie. Zkratky: IL-10 (inteleukinu 10), INF $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ), ROS (kyslíkové radikály, reactive oxygen species), TNF $\alpha$  (faktor nekrotizace nádorů  $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ) (převzato z Monsel et al., 2014).

## 6. MSCs a extracelulární váčky

MSCs mohou uvolňovat extracelulární váčky (EVs, extracellular vesicles), které se dělí na dva typy – exosomy o velikosti 40 – 100 nm a mikrovezikuly o velikosti 50 - 1000 nm. Jsou součástí endosomálního prostoru buňky zprostředkovávající např. výměnu látek a komunikaci mezi buňkami. EVs mohou obsahovat mikroRNA (miRNA, microRNA) i různé molekuly, jako jsou cytokiny, růstové faktory a další (Keane et al., 2017, Merino-González et al., 2016). U exosomů z moči byly objeveny různé AMPs, které inhibovaly bakteriální růst (Hiemstra et al., 2014). Tudíž by EVs uvolňované MSCs mohly obsahovat také AMPs.

MSCs uvolňují mikrovezikuly (MVs, microvesicles). MVs uvolněné MSCs (MMVs, microvesicles derived from MSCs) se v poslední době zdají biologicky významné u zánětů a poranění tkání (Zhu et al., 2014). Monsel et al. ve své studii testovali, jestli MMVs mají nebo se podílejí na antimikrobiálních vlastnostech MSCs. MMVs izolovali z MSCs získaných z kostní dřeně. Myš infikovali  $2-3 \times 10^6$  CFU *E. coli* a po 4 hodinách intratracheálně aplikovali MMVs. Do dvou ostatních skupin myši intratracheálně aplikovali MSCs jako pozitivní kontrolu a PBS jako negativní kontrolu. BAL z myši byla odebrána po 18, 24 nebo 72 hodinách. V porovnání s negativní kontrolou, MMVs zvýšily počet přeživších myši, ale na druhou stranu byl počet srovnatelný s pozitivní kontrolou. Navíc MMVs i MSCs v pozitivní kontrole srovnatelně zvýšily produkci KGF a snížily bakteriální růst. Použitím protilátky anti-KGF se prokázal antimikrobiální efekt KGF. Vedle tohoto antimikrobiálního efektu MMVs podporují zvýšení počtu monocytů/makrofágů, snižují množství TNF $\alpha$  a zvyšují množství PGE2 a IL-10, které mají vliv na indukci makrofágů na M2 fenotyp (Monsel et al., 2015).

Jak už bylo řečeno, MSCs mohou uvolňovat i exosomy. Song et al. aktivovali MSCs pomocí IL-1 $\beta$ . V *in vitro* i *in vivo* modelech sepse prokázali, že tyto MSCs uvolňují exosomy, které obsahují miRNA, konkrétně miR-146a. Tato miRNA je známá svými protizánětlivými vlastnostmi. Prostřednictvím miR-146a mohou exosomy regulovat polarizaci makrofágů v M2 fenotyp, což se projevilo na zvýšeném přežití myši při sepsi (Song et al., 2017).

Vedle uvolňování váček mohou MSCs uvolňovat mitochondrie, které pomáhají poraněným buňkám. MSCs společně s epiteliálními buňkami vytvoří nanotubuly, kterými

přepřavuje mitochondrie do poraněných a infikovaných buněk (Mahrouf-Yorgov et al., 2017, Jiang et al., 2016).

## 7. Závěr

MSCs jsou buňky s mnoha unikátními schopnostmi a vlastnostmi, které se mohou měnit v závislosti na mikroprostředí. Zájem o využití MSCs v terapii se stále zvyšuje, v současné době probíhá přes 800 klinických studií (Clinicaltrial.gov, online), které využívají MSCs především pro léčbu autoimunitních onemocnění, při transplantacích nebo poraněních. Vedle diferenciačních, migračních, cytoprotektivních a imunomodulačních vlastností se v posledních letech zvyšuje zájem i o nedávno popsané antimikrobiální schopnosti.

Ukazuje se, že MSCs jsou schopné identifikovat a reagovat na různé druhy infekcí. Podle druhu a rozsahu infekce kontrolují sekreci AMPs, a dokonce i různé kombinace těchto AMPs. Studie provedené v posledních letech prokázaly, že MSCs sekretují Cat LL-37,  $\beta$ D, Lcn 2, Hcn aIDO, které účinně a přímo působí proti bakteriím. Mimo to jsou MSCs schopné prostřednictvím sekretovaných a povrchových molekul, jako je například PGE2, IL6, HGF, CD54, PD-L1/2 a NO, ovlivňovat buňky imunitního systému. Účinnost svého antimikrobiálního působení v místě zánětu či infekce tak mohou MSCs zvýšit i tím, že působí na fagocytózu a aktivitu makrofágů a neutrofilů a také tím, že celkově regulují průběh imunitní reakce a podporují regenerativní procesy. Další studie se zabývaly extracelulární váčky uvolňovanými MSCs. Ukazuje se, že mají srovnatelné antimikrobiální vlastnosti jako buňky samotné, tudíž by mohly být v alternativou MSCs.

Díky všem těmto vlastnostem by tak MSCs mohly v budoucnu podpořit, nebo dokonce nahradit léčbu antibiotiky. Avšak pro jejich budoucí terapeutické využití je nutné více prozkoumat a objasnit přesné mechanismy jejich regulace a působení.

## 8. Použité zdroje

- \*Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J. and Khoury, M. (2017) 'Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies', *Frontiers in Immunology*, 8, pp. 15.
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Martin, A., Contreras, L., Figueroa, F. E. and Khoury, M. (2015) 'Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis', *Stem Cell Research & Therapy*, 6, pp. 199.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R. and Pennesi, G. (2005) 'Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway', *European Journal of Immunology*, 35(5), pp. 1482-1490.
- Berger, T., Togawa, A., Duncan, G. S., Elia, A. J., You-Ten, A., Wakeham, A., Fong, H. E., Cheung, C. C. and Mak, T. W. (2006) 'Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(6), pp. 1834-1839.
- Brandau, S., Jakob, M., Bruderek, K., Bootz, F. and Giebel, B. (2014) 'Mesenchymal Stem Cells Augment the Anti-Bacterial Activity of Neutrophil Granulocytes (vol 9, e106903, 2014)', *Plos One*, 9(11), pp. 1.
- Brown, J. M., Nemeth, K., Kushnir-Sukhov, N. M., Metcalfe, D. D. and Mezey, E. (2011) 'Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism', *Clinical and Experimental Allergy*, 41(4), pp. 526-534.
- Cassatella, M. A., Mosna, F., Micheletti, A., Lisi, V., Tamassia, N., Cont, C., Calzetti, F., Pelletier, M., Pizzolo, G. and Krampera, M. (2011) 'Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils', *Stem Cells*, 29(6), pp. 1001-1011.

- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V. and Uccelli, A. (2006) 'Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions', *Blood*, 107(1), pp. 367-372.
- Devaney, J., Horie, S., Masterson, C., Elliman, S., Barry, F., O'Brien, T., Curley, G. F., O'Toole, D. and Laffey, J. G. (2015) 'Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by E. coli in the rat', *Thorax*, 70(7), pp. 625-635.
- Di Trapani, M., Bassi, G., Midolo, M., Gatti, A., Kamga, P. T., Cassaro, A., Carusone, R., Adamo, A. and Krampera, M. (2016) 'Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions', *Scientific Reports*, 6, pp. 13.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. and Horwitz, E. M. (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315-317.
- Franquesa, M., Herrero, E., Torras, J., Ripoll, E., Flaquer, M., Goma, M., Lloberas, N., Anegon, I., Cruzado, J. M., Grinyo, J. M. and Herrero-Fresneda, I. (2012) 'Mesenchymal Stem Cell Therapy Prevents Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in a Rat Kidney Allograft Model', *Stem Cells and Development*, 21(17), pp. 3125-3135.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky, S., II and Petrakova, K. V. (1966) 'Osteogenesis in transplants of bone marrow cells', *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(3), pp. 381-390.
- \*Gazdic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N. and Stojkovic, M. (2015) 'Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases', *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(2), pp. 280-287.
- \*Glenn, J. D. and Whartenby, K. A. (2014) 'Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy', *World Journal of Stem Cells*, 6(5), pp. 526-539.

- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W. and Dazzi, F. (2005) 'Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells', *Blood*, 105(7), pp. 2821-2827.
- Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., Gonzalez, M. A., Rico, L., Buscher, D. and Delgado, M. (2009) 'Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis', *Gut*, 58(7), pp. 929-939.
- Gu, Y. J., Li, T., Ding, Y. L., Sun, L. X., Tu, T., Zhu, W., Hu, J. B. and Sun, X. C. (2016) 'Changes in mesenchymal stem cells following long-term culture in vitro', *Molecular Medicine Reports*, 13(6), pp. 5207-5215.
- Gupta, N., Krasnodembskaya, A., Kapetanaki, M., Mouded, M., Tan, X., Serikov, V. and Matthay, M. A. (2012) 'Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine Escherichia coli pneumonia', *Thorax*, 67(6), pp. 533-539.
- Hajkova, M., Javorkova, E., Zajicova, A., Trosan, P., Holan, V. and Krulova, M. (2017) 'A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(5), pp. 1456-1465.
- Halabian, R., Tehrani, H. A., Jahanian-Najafabadi, A. and Habibi Roudkenar, M. (2013) 'Lipocalin-2-mediated upregulation of various antioxidants and growth factors protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against unfavorable microenvironments', *Cell Stress and Chaperones*, 18(6), pp. 785-800.
- Hall, S. R., Tsoyi, K., Ith, B., Padera, R. F., Jr., Lederer, J. A., Wang, Z., Liu, X. and Perrella, M. A. (2013) 'Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: the importance of neutrophils', *Stem Cells*, 31(2), pp. 397-407.
- Hiemstra, T. F., Charles, P. D., Gracia, T., Hester, S. S., Gatto, L., Al-Lamki, R., Floto, R. A., Su, Y., Skepper, J. N., Lilley, K. S. and Karet Frankl, F. E. (2014) 'Human urinary exosomes as innate immune effectors', *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(9), pp. 2017-2027.
- Jiang, D., Gao, F., Zhang, Y., Wong, D. S. H., Li, Q., Tse, H., Xu, G., Yu, Z. and Lian, Q. (2016) 'Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects

corneal epithelial cells from mitochondrial damage', *Cell Death and Disease: Vol. 11*, pp. e2467-.

Jiang, X. X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S. X., Wu, Y., Yu, X. D. and Mao, N. (2005) 'Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells', *Blood*, 105(10), pp. 4120-4126.

Johnson, V., Webb, T., Norman, A., Coy, J., Kurihara, J., Regan, D. and Dow, S. (2017) 'Activated Mesenchymal Stem Cells Interact with Antibiotics and Host Innate Immune Responses to Control Chronic Bacterial Infections', *Scientific Reports*, 7, pp. 18.

\*Keane, C., Jerkic, M. and Laffey, J. G. (2017) 'Stem Cell-based Therapies for Sepsis', *Anesthesiology*, 127(6), pp. 1017-1034.

Kim, J. and Hematti, P. (2009) 'Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages', *Experimental Hematology*, 37(12), pp. 1445-1453.

Kol, A., Foutouhi, S., Walker, N. J., Kong, N. T., Weimer, B. C. and Borjesson, D. L. (2014) 'Gastrointestinal Microbes Interact with Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro and Enhance Immunomodulatory Functions', *Stem Cells and Development: Vol. 16*, pp. 1831-1843.

Kong, Q. F., Sun, B., Bai, S. S., Zhai, D. X., Wang, G. Y., Liu, Y. M., Zhang, S. J., Li, R., Zhao, W., Sun, Y. Y., Li, N., Wang, Q., Peng, H. S., Jin, L. H. and Li, H. L. (2009) 'Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta', *Journal of Neuroimmunology*, 207(1-2), pp. 83-91.

Krasnodembskaya, A., Samarani, G., Song, Y., Zhuo, H., Su, X., Lee, J. W., Gupta, N., Petrini, M. and Matthay, M. A. (2012) 'Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes', *American Journal of Physiology-Lung Cell Molecular Physiology*, 302(10), pp. L1003-1013.

- Krasnodembskaya, A., Song, Y. L., Fang, X. H., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J. W. and Matthay, M. A. (2010) 'Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37', *Stem Cells*, 28(12), pp. 2229-2238.
- Luo, C. J., Zhang, F. J., Zhang, L., Geng, Y. Q., Li, Q. G., Hong, Q., Fu, B., Zhu, F., Cui, S. Y., Feng, Z., Sun, X. F. and Chen, X. M. (2014) 'Mesenchymal stem cells ameliorate sepsis-associated acute kidney injury in mice', *Shock*, 41(2), pp. 123-129.
- Mahrouf-Yorgov, M., Augeul, L., Da Silva, C. C., Jourdan, M., Rigolet, M., Manin, S., Ferrera, R., Ovize, M., Henry, A., Guguin, A., Meningaud, J. P., Dubois-Rande, J. L., Motterlini, R., Foresti, R. and Rodriguez, A. M. (2017) 'Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties', *Cell Death and Differentiation*, 24(7), pp. 1224-1238.
- \*Mattar, E. H., Almehdar, H. A., Yacoub, H. A., Uversky, V. N. and Redwan, E. M. (2016) 'Antimicrobial potentials and structural disorder of human and animal defensins', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 28, pp. 95-111.
- Mei, S. H., Haitzma, J. J., Dos Santos, C. C., Deng, Y., Lai, P. F., Slutsky, A. S., Liles, W. C. and Stewart, D. J. (2010) 'Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis', *Am J Respir Critical Care Medicine*, 182(8), pp. 1047-1057.
- Meisel, R., Brockers, S., Heseler, K., Degistirici, O., Bulle, H., Woite, C., Stuhlsatz, S., Schwippert, W., Jager, M., Sorg, R., Henschler, R., Seissler, J., Dilloo, D. and Daubener, W. (2011) 'Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase', *Leukemia*, 25(4), pp. 648-654.
- \*Merino-González, C., Zuñiga, F. A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., Salomón, C. and Aguayo, C. (2016) 'Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application', *Frontiers in Physiology*, Vol. 7. pp. 1-9

- Mohammadzadeh, A., Pourfathollah, A. A., Shahrokhi, S., Hashemi, S. M., Moradi, S. L. and Soleimani, M. (2014) 'Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets', *Int Immunopharmacol*, 20(2), pp. 316-21.
- Monsel, A., Zhu, Y. G., Gennai, S., Hao, Q., Hu, S., Rouby, J. J., Rosenzweig, M., Matthay, M. A. and Lee, J. W. (2015) 'Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell-derived Microvesicles in Severe Pneumonia in Mice', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(3), pp. 324-36.
- \*Monsel, A., Zhu, Y. G., Gennai, S., Hao, Q., Liu, J. and Lee, J. W. (2014) 'Cell-based therapy for acute organ injury: preclinical evidence and ongoing clinical trials using mesenchymal stem cells', *Anesthesiology*, 121(5), pp. 1099-121.
- Najar, M., Fayyad-Kazan, M., Meuleman, N., Bron, D., Fayyad-Kazan, H. and Lagneaux, L. (2018) 'Immunomodulatory effects of foreskin mesenchymal stromal cells on natural killer cells', *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), pp. 5243-5254.
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T. and Kaplan, J. (2004) 'Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization', *Science*, 306(5704), pp. 2090-2093.
- Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A. and Mezey, E. (2009) 'Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production', *Natural Medicine*, 15(1), pp. 42-49.
- Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I. R. and Zipori, D. (2007) 'Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions', *Blood*, 109(4), pp. 1422-1432.
- \*Pinheiro da Silva, F. and Machado, M. C. (2012) 'Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications', *Peptides*, 36(2), pp. 308-314.
- Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L. and Pistoia, V. (2008) 'Human mesenchymal stem cells inhibit

neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche', *Stem Cells*, 26(1), pp. 151-162.

Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M. N., Bouchentouf, M., Spaner, D. E. and Galipeau, J. (2009) 'Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype', *The Journal of Immunology*, 182(12), pp. 7963-7973.

Song, Y., Dou, H., Li, X., Zhao, X., Li, Y., Liu, D., Ji, J., Liu, F., Ding, L., Ni, Y. and Hou, Y. (2017) 'Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1beta-Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis', *Stem Cells*, 35(5), pp. 1208-1221.

Sonnweber, T., Nachbaur, D., Schroll, A., Nairz, M., Seifert, M., Demetz, E., Haschka, D., Mitterstiller, A. M., Kleinsasser, A., Burtscher, M., Trubsbach, S., Murphy, A. T., Wroblewski, V., Witcher, D. R., Mleczko-Sanecka, K., Vecchi, C., Muckenthaler, M. U., Pietrangelo, A., Theurl, I. and Weiss, G. (2014) 'Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB', *Gut*, 63(12), pp. 1951-1959.

Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C. and Moretta, L. (2008) 'Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2', *Blood*, 111(3), pp. 1327-1333.

Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C. and Moretta, L. (2006) 'Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation', *Blood*, 107(4), pp. 1484-1490.

\*Spaggiari, G. M. and Moretta, L. (2013) 'Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity', *Immunology and Cell Biology*, 91(1), pp. 27-31.

\*Squillaro, T., Peluso, G. and Galderisi, U. (2016) 'Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update', *Cell Transplant*, 25(5), pp. 829-848.

- Sung, D. K., Chang, Y. S., Sung, S. I., Yoo, H. S., Ahn, S. Y. and Park, W. S. (2016) 'Antibacterial effect of mesenchymal stem cells against Escherichia coli is mediated by secretion of beta- defensin- 2 via toll- like receptor 4 signalling', *Cellular Microbiology*, 18(3), pp. 424-436.
- Sutton, M. T., Fletcher, D., Ghosh, S. K., Weinberg, A., van Heeckeren, R., Kaur, S., Sadeghi, Z., Hijaz, A., Reese, J., Lazarus, H. M., Lennon, D. P., Caplan, A. I. and Bonfield, T. L. (2016) 'Antimicrobial Properties of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Potential for Cystic Fibrosis Infection, and Treatment', *Stem Cells International*, pp. 12.
- Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P. and Holan, V. (2012) 'The Role of Mouse Mesenchymal Stem Cells in Differentiation of Naive T-Cells into Anti-Inflammatory Regulatory T-Cell or Proinflammatory Helper T-Cell 17 Population', *Stem Cells and Development*, 21(6), pp. 901-910.
- \*Uccelli, A., Moretta, L. and Pistoia, V. (2008) 'Mesenchymal stem cells in health and disease', *Nature Reviews Immunology*, 8(9), pp. 726-736.
- \*Ullah, I., Subbarao, R. B. and Rho, G. J. (2015) 'Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective', *Bioscience Reports*, 35, pp. 18.
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L. and Betancourt, A. M. (2010) 'A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype', *Plos One: Vol. 4*. pp. 1-14
- Zhao, X., Liu, D., Gong, W., Zhao, G., Liu, L., Yang, L. and Hou, Y. (2014) 'The toll-like receptor 3 ligand, poly(I:C), improves immunosuppressive function and therapeutic effect of mesenchymal stem cells on sepsis via inhibiting MiR-143', *Stem Cells*, 32(2), pp. 521-33.
- Zhu, Y. G., Feng, X. M., Abbott, J., Fang, X. H., Hao, Q., Monsel, A., Qu, J. M., Matthay, M. A. and Lee, J. W. (2014) 'Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice', *Stem Cells*, 32(1), pp. 116-125.

**Další zdroje:**

Mesenchymal stem cells, Clinicaltrial.gov [online databáze]. Aktualizováno: 04. 04. 2018  
[cit. 2. 5. 2018]. Dostupné z:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=mesenchymal+stem+cells&cntry=&state=&city=&dist=>

\* Sekundární citace