

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Tomáš Kašpar

**Mezenchymální kmenové buňky jako nosiče léčiv pro terapii nádorových
onemocnění**

Mesenchymal stem cells as carriers of drugs for the treatment of tumors

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:

doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2019

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, 6. 5. 2019

Podpis

Abstrakt

Zejména v posledních letech se mezenchymální kmenové buňky (MSCs) stávají hojně využívaným nástrojem pro dopravu léčiv díky jejich unikátním imunomodulačním a migračním schopnostem. Pomocí různých přístupů, například využitím nanočástic s internalizovaným léčivem, onkolytických virů a pomocí genové terapie lze tyto vlastnosti ještě rozšířit. Cílem této práce je shrnout poznatky o použití mezenchymálních kmenových buněk jako nosičů spolu s danými metodami, které dokážou efektivně rozšířit jejich terapeutické vlastnosti na poli léčby nádorových onemocnění.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, rakovina, nanočástice, onkolytické viry, genová terapie

Abstract

Over few past decades mesenchymal stem cells (MSCs) have become widely used tool for the therapeutic drug delivery into the organisms. In particular, unique immunomodulatory and migratory properties of MSCs are used to address this task. Many approaches, as for example nanoparticles loaded with drugs, oncolytic viruses and gene therapy are employed to further improve delivery qualities of MSCs. The purpose of this assay is to summarize current knowledge about the usage of MSCs as drug carriers, together with methods which can effectively widen therapeutic abilities of MSCs in the field of the cancer therapy.

Key words: mesenchymal stem cells, cancer, nanoparticles, oncolytic viruses, gene therapy

Seznam zkratek

MSCs	mezenchymální kmenové buňky
IL	interleukin
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
mRNA	mediátorová RNA
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
i.v.	intravenózní
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
CCR7	C-C motif chemokine receptor
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CCL19	C-C chemokine motif ligand 19
HGF	hepatocytární růstový faktor
VCAM-1	vascular adhesion protein 1
PI3-K	fosfatidylinositol-3-kináza
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
PKC	proteinkináza C
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EGF	epidermální růstový faktor
NPs	nanočástice
PEG	polyethylenglykon
PLGA	poly(lactic-co-glycolic acid)
DOX	docetaxel
Ptx	paclitaxel
SPIONs	superparamagnetické nanočástice oxidu železitého
HSV-TK	herpes-simplex-virus tyrosin kináza
GCV	ganciclovir

S-TRAIL	soluble tumor necrosis factor-related apoptosis
CD	cytosin deamináza
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
DAMPs	damage-associated molecular patterns
D24RGD	adenovirový vektor Delta-24-RGD
IFN	interferon
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis
NK4	antagonista-HGF
iCasp9	inducibilní kaspáza 9
CID	chemický dimerizaci indukující faktor

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract	4
Seznam zkratek	5
1 Úvod a cíle práce	8
2 Distribuce MSCs.....	11
2.1 Podání MSCs.....	11
2.2 Cílení migrace MSCs.....	12
2.3 Zvýšení účinnosti migrace	13
2.3.1 Kultivace za specifických podmínek.....	13
2.3.2 Genetické modifikace.....	13
2.3.3 Jiné způsoby modifikace povrchových znaků	14
2.3.4 Modifikace cílové tkáně	14
3 Použití MSCs jako buněčně zprostředkovaných systémů pro dopravu léčiv	16
3.1 Nanočástice	16
3.1.1 Polymerní nanočástice	17
3.1.2 Magnetické nanočástice.....	17
3.2 Prekurzory léčiv specifické pro tumory.....	19
3.2.1 Herpes-simplex-virus tymidin kináza	19
3.2.2 Cytosin deamináza	20
3.3 Onkolytické viry	20
3.3.1 Adenoviry	21
3.3.2 Virus spalniček	21
3.4 Genová terapie	21
3.4.1 Interferony	21
3.4.2 Interleukiny	23
3.4.3 TRAIL	23
3.4.4 NK4	24
4 Kontroverze při používání kmenových buněk.....	25
5 Závěr	26
6 Seznam literatury	27
7 Seznam obrázků	34

1 Úvod a cíle práce

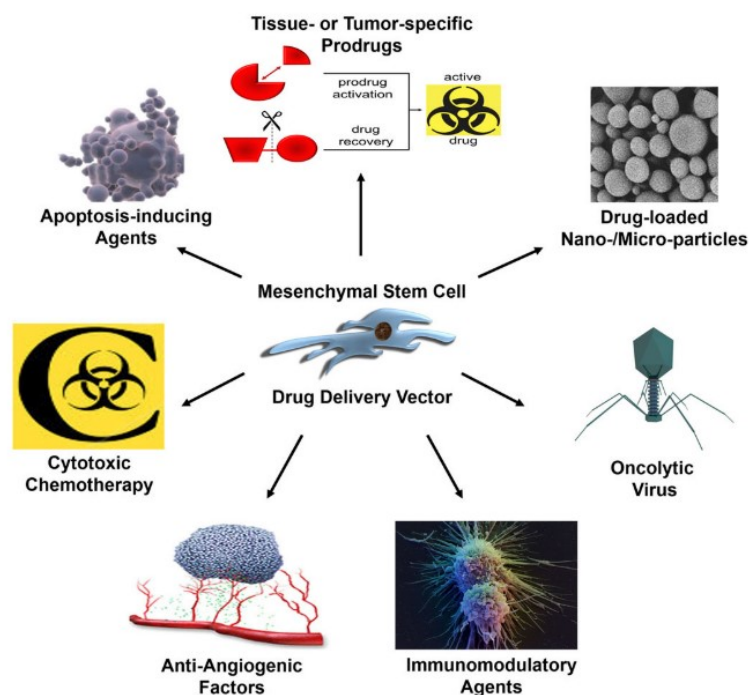
Cílem této práce je formou rešerše shrnout dosavadní poznatky o terapiích využívajících mezenchymální kmenové buňky (MSCs; z anglického Mesenchymal Stem Cells), zejména pro léčbu nádorových onemocnění. První část práce nazvaná „Distribuce MSCs“ je zaměřena především na schopnost migrace MSCs a postupů, jak tuto migraci zefektivnit. Druhá část se již zabývá samotnými terapeutickými přístupy využívající MSCs spolu s nanočásticemi, prekursorů léčiv, onkolytickými viry nebo genovou terapií v léčbě nádorových onemocnění.

MSCs vzbuzují především v posledních letech veliký zájem vědců. To především díky vlastnostem, jakými jsou například jejich snadná izolace a kultivace, pluripotence, diferenciační potenciál, snadná modifikace a nízká imunogenicita v organismu, do něhož jsou aplikovány. Toho lze využít zejména pro nejrůznější způsoby léčby široké škály nemocí. Ať už autoimunitních chorob (revmatická artritida, diabetes), různých forem fibróz (jaterní cirhóza), nebo neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba či Huntingonova choroba), jak shrnul ve své studii z roku 2006 Corradetti.

MSCs byly definovány v roce 2006 Mezinárodní společností pro buněčnou terapii pomocí tří základních kritérií. Prvním je adherence k plastu při kultivaci za standardních podmínek. Druhým kritériem je exprese specifických povrchových antigenů jako například CD105, CD73, a CD90 či naopak jejich absence, nebo nízká exprese na membráně MSCs ($\leq 2\%$), sem patří CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, či MHC II. třídy. Poslední z těchto tří podmínek je schopnost diferenciace za standardních *in vitro* podmínek, a to konkrétně v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty. K těmto základním vlastnostem MSCs patří dále také snadná izolace buněk z kostní dřeně a celé řady dalších tkání (Dominici *et al.*, 2006).

Pomocí produkce celé řady biologicky aktivních látek (například růstových faktorů a cytokinů) dokáží MSCs inhibovat apoptózu buněk, inhibovat tvorbu fibrotické tkáně, podporovat angiogenezi a především dokáží aktivně ovlivnit imunitní systém. MSCs jsou schopné podpořit obnovu poškozených tkání, a proto se pro regenerativní účely využívají již od poloviny minulého století (Corradetti *et al.*, 2016).

Vzhledem k možnostem snadné genetické modifikace, nízké imunogenicitě, pomocí které mohou být při terapiích používány i allogenní MSCs, a zejména díky jejich imunomodulačním schopnostem již proběhlo téměř tisíc klinických testů s MSCs¹ využívajících především jejich schopnost parakrinně ovlivňovat funkce imunitního systému. Další klinické testy jsou zaměřeny na využití MSCs pro léčbu nádorových onemocnění. Důležitým předpokladem pro využití v této oblasti je cílená migrace do místa zánětu, což zahrnuje i mikroprostředí nádoru. MSCs podobně jako leukocyty v místě zánětu aktivně modulují imunitní systém. To skýtá možná využití pro další léčebné zásahy zprostředkované MSCs přímo na místě určení, například pomocí cílené cytotoxické terapie, dopravy imunoregulačních molekul či agens indukujících apoptózu, onkolytických virů, anti-angiogenních faktorů či nanočástic s internalizovaným léčivem přímo do místa působení (viz obrázek 1) (Krueger *et al.*, 2018).



Obrázek 1: Možnosti použití MSCs jako terapeutického agens (převzato z Krueger *et al.*, 2018)

Při kultivaci MSCs za fyziologických podmínek lze detekovat mRNA pro celou škálu cytokinů, jako například interleukin- (IL-) 6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 a M-CSF (Majumdar *et al.*, 1998). Celá řada z těchto cytokinů se může aktivně přímo či

¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mesenchymal+stem+cell>

zprostředkovaně podílet na potlačování a léčení nádorového bujení. Jedná se především o IL-12 a dále IL-2, nebo interferony všech typů (Weiss *et al.*, 2007).

Ačkoliv buněčné terapie spojené s MSCs znějí velice slibně, stále zůstává celá řada faktorů, které se musí při podávání MSCs a jimi zprostředkované léčby vyřešit. Tyto problémy jsou zejména způsobené velikostí MSCs v porovnání s průměrem nejmenších kapilár. Relativně velké MSCs jsou zde často mechanicky zachyceny. Zjevným problémem tak zůstává nízká efektivita migrace do místa určení (Krueger *et al.*, 2018). Dalším kritériem je, že MSCs nesmí škodit v organismu, do kterého jsou aplikovány, a proto je potřebná úprava nativních MSCs, jejichž role při vývoji rakoviny zůstává stále kontroverzní a ne zcela objasněná. Bylo provedeno mnoho studií, které ukazují na tumor-supresivní účinky, ale na druhou stranu i těch které poukazují na tumor-progresivní vlastnosti MSCs. Tyto vlastnosti jsou závislé na mnoha faktorech (Yagi *et al.*, 2013).

2 Distribuce MSCs

Buňkami zprostředkované systémy pro dopravu léčiv mohou využívat jako nosiče celou řadu buněčných typů, jako například erytrocyty, leukocyty a v neposlední řadě také MSCs. Po internalizaci terapeutického agens se upravené buňky mohou dostávat až do místa specifického pro danou chorobu (Pang *et al.*, 2017). První z metod dokazující možnost využití buněk k tomuto účelu je ze 70. let minulého století, kdy červené krvinky byly úspěšně využity jako nosiče enzymů β -glukosidáza a β -galaktosidáza pro léčbu Gaucherovy choroby. Tímto objevem se otevřely nové možnosti pro budoucí výzkum buňkami zprostředkované dopravy léčiv (Ihler *et al.*, 1973).

MSCs jsou výborným vektorem díky samovolné migraci do místa zánětu, zranění či do celé řady nádorů, jak bylo dokázáno například u rakoviny plic (Wang *et al.*, 2019), žaludku (Zhu *et al.*, 2014), hepatomu (Qiao *et al.*, 2008) a řady dalších typů. Díky tomu mohou pomoci k obnově poškozených tkání *in situ* a mohou snížit systémovou toxicitu u léčiv s necílenou distribucí, s krátkou dobou života a s celou řadou vedlejších účinků (Dembinski *et al.*, 2010).

2.1 Podání MSCs

Pro podání MSCs do organismu existují dva nejčastěji využívané způsoby. Prvním je lokální aplikace do tkáně, či místa poškození a druhým je systémové podání MSCs do těla krevním oběhem, například intravenózně (i.v.).

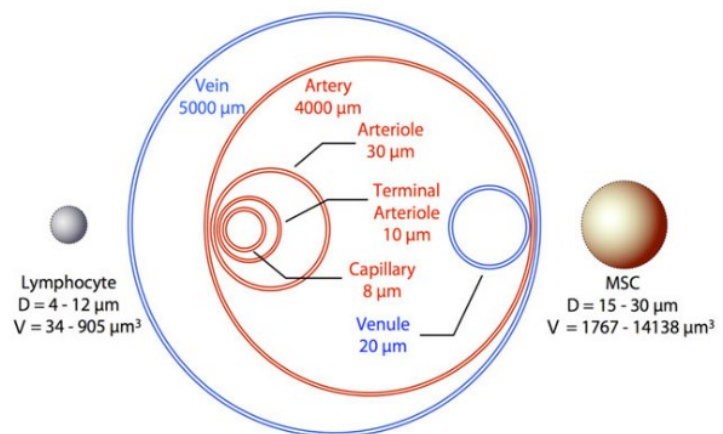
Při i.v. podání je většina buněk krevním oběhem dopravena do plic a dále do jater a sleziny. Pokud je v organismu přítomen nádor, tak jsou MSCs schopné migrovat i k němu a zde se poté dokáží efektivně zachytit do architektury nádoru a proliferovat (Studený *et al.*, 2002).

Bohužel při podání MSCs i.v. mizí valná většina buněk během první desítek minut z krevního oběhu. Relativně velké MSCs se zachytávají v plicních kapilárách a odsud jsou velice efektivně odstraněny. Toto rapidní vychytávání je jak v lidském i ve zvířecím modelu vždy následováno akumulací v játrech a ve slezině během dalších hodin až dní (Krueger *et al.*, 2018).

Vyhnout se tak drastickému vychytávání buněk v plicních kapilárách lze například vpichem do artérie namísto vény a tím se minimálně při první cirkulaci vyhnout této

překážce. Například při studii na myších byly fluorescenčně značené MSCs vpraveny do organismu intraarteriálně. Bohužel většina z těchto buněk byla záhy zachycena v kapilárách svalů ve směru toku krve, což zapříčinilo zastavení proudění v těchto ucpaných kapilárách a po pěti minutách dokonce nebyly detektovány v krevním řečišti žádné buňky (Toma *et al.*, 2009).

Je nasnadě, že toto poněkud náhodné cestování krevním řečištěm v prvních okamžicích má své negativní dopady. A to zejména v podobě zachytávání MSCs v kapilárách kvůli jejich velikosti (viz obrázek 2), tedy možné tvorby plicních embolií a tvorby trombů v krevním řečišti. Těm lze do značné míry zabránit souběžným podáním antikoagulantů, jako například thrombomodulinu (Tatsumi *et al.*, 2013), nebo heparinu (Yukawa *et al.*, 2012), či, pokud je to možné, lokálním podáním MSCs (Tatsumi *et al.*, 2013).



Obrázek 2: Porovnání velikostí vén a artérií vůči velikosti MSCs a lymfocytu (převzato z Krueger *et al.*, 2018)

2.2 Cílení migrace MSCs

Přesný mechanismus migrace a pronikání MSCs do místa určení (tedy místa zánětu či rakoviny) není pořád dostatečně osvětlen. Existují však vodítka, jež napovídají, že k tomu používají stejné nebo podobné mechanismy jako lymfocyty. Ty jsou zachyceny pomocí adhezivních molekul, tak zpomalí svou rychlost po krevním řečišti v kontaktu s endoteliálními buňkami. Následně jsou aktivovány receptory spřažené s G-proteiny. A nakonec buňky pronikají skrze endotel a basální membránu (Butcher *et al.*, 1996).

Byla studována celá řada molekul, které pomáhají a jsou zahrnuty v migraci MSCs do místa zánětu. A každá z těchto specifických molekul působí v různých krocích této migrace a napomáhá cílení migrace do specifických orgánů. V první fázi jsou zásadní selektiny na endotelu, které pomáhají zachytávání MSCs. Dalšími molekulami důležitými zejména pro

aktivaci jsou receptory spřažené s G-proteiny, typicky chemokinové receptory. Například pro migraci do kostní dřeně je nezbytně nutná aktivita chemokinů SDF-1 (z anglického stromal cell-derived factor 1) (Becker *et al.*, 2016).

Chemotaxe do místa tumoru může být dále zprostředkována pomocí chemokinových receptorů CCR7 a CXCR4 na povrchu MSCs a jejich ligandů CCL19 a SDF-1. Specifické propojení receptorů s jejich ligandy umožňuje migraci MSCs do místa nádoru. Nicméně konkrétní mechanismy zůstávají stále předmětem výzkumu (Ruan *et al.*, 2012).

2.3 Zvýšení účinnosti migrace

Zvýšená efektivita cílení migrace a prodloužená doba retence MSCs v tkáních by značně zvýšila účinnost terapií. Proto byla vyvinuta řada strategií, jak tuto efektivitu zvýšit. Jednou z možných strategií je úprava kultivačních podmínek tak, aby MSCs produkovaly více molekul podporujících migraci do cílové tkáně, například prostřednictvím interakce CXCR4-SDF-1. Účinnost migrace lze zvýšit pomocí genetické modifikace MSCs, či jinou úpravou jejich povrchových molekul anebo lze upravit cílovou tkáň, například pomocí ozáření, elektrického pole či magnetických nanočástic.

2.3.1 Kultivace za specifických podmínek

Jednou ze snah, jak zvýšit efektivitu cílené léčby, je pomocí chemokinového receptoru CXCR4. Zvýšené exprese povrchového CXCR4 v MSCs lze dosáhnout například přidáním koktejlu cytokinů (IL-6, hepatocytárního růstového faktoru a dalších) do kultivačního média. Tyto faktory zvýší expresi CXCR4. Buňky exprimující CXCR4 poté mají mnohem vyšší migrační potenciál ke gradientu SDF-1, který je produkován kostní dření i v místě tumoru (Shi *et al.*, 2007).

2.3.2 Genetické modifikace

Další přístup, jak efektivně zvýšit migraci MSCs, je pomocí genetických modifikací. Zde se otvírá nespočet možností, které molekuly či které povrchové receptory ovlivnit.

Jednou z mnoha může být například VCAM-1 (z anglického vascular cell adhesion molecule 1), která se nachází na povrchu cévního endotelu. Zvýšením exprese molekuly integrinu $\alpha 4$, která zajišťuje buněčné interakce s molekulou VCAM-1, došlo ke zvýšení

účinnosti migrace MSCs do kostí, což může být využito například pro cílení léčby osteopenie či metastází v kostech (Kumar *et al.*, 2007).

Trochu jiný přístup byl zvolen pro molekulu receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), kdy bylo ukázáno, že EGFR má schopnost ovlivňovat přímo, či nepřímo migraci celé řady buněk. To platí i v případě MSCs transdukovaných retrovirovým vektorem genem pro EGFR. Následné sledování *in vitro* ukázalo zvýšenou schopnost MSCs migrace ke kultuře buněk gliomu v porovnání s kontrolními MSCs. Zvýšená migrace se ukázala být závislá na jednotlivých krocích signalizačních kaskád kináz PI3-K, MAPK, PKC a na polymerizaci aktinu po navázání epidermálního růstového faktoru (EGF) na extracelulární část EGFR, která poté aktivuje svou cytoplasmatickou tyrozin kinázu a rekrutuje výše zmíněné efektorové molekuly. V této studii byla sledována migrace ovlivněných MSCs po přidání inhibitorů pro jednotlivé procesy, ať už polymerizaci aktinu, či kinázových signalizačních kaskád. Zde vyvstává důležitá otázka bezpečnosti této metody, neboť je známo, že zvýšená exprese EGFR je spojena s výskytem několika druhů rakoviny, jako například karcinomu krku a hlavy, adenokarcinomu či právě gliomu. Pro zjištění zvýšeného migračního potenciálu *in vitro* byly MSCs transdukované genem pro EGFR vpraveny do basálních ganglií athymických myší a po čtyřech dnech analyzovány na dvoufotonovém mikroskopu. Byla potvrzena migrační schopnost buněk k místu gliomu a takto transdukované MSCs neukázali žádné tumorogenní vlastnosti (Sato *et al.*, 2005).

2.3.3 Jiné způsoby modifikace povrchových znaků

Dalším způsobem, jak pozitivně ovlivnit migraci MSCs, je za využití již výše zmíněné molekuly SDF-1, jejíž gradient ukazuje cestu k poškozeným tkáním i k některým nádorům. MSCs byly upravené konjugační molekulou PEG (polyethylenglykol) s navázaným CXCR4. PEG díky svým hydrofobním vlastnostem po interakci s lipidovou částí membrány dokázal neinvazivně zainkorporovat molekulu CXCR4 do membrány MSCs. Takto modifikované MSCs ukazují až dvojnásobný potenciál při migraci za gradientem SDF-1 (Won *et al.*, 2014).

2.3.4 Modifikace cílové tkáně

V myším modelu bylo ukázáno, že tkáně vystavené lokálnímu ozáření, které může být způsobeno třeba i při léčbě rakoviny ozařováním, mají zvýšený potenciál pro cílenou migraci MSCs. Celkové ozáření organismu pak zvýšilo celkový počet MSCs přítomných ve

tkáních, a to zejména v mozku, srdci, játrech, kostní dřeni a svalech. V porovnání s kontrolními, neozářenými myšmi, kde se buňky po 14 dnech nacházely zejména v plicích, kostní dřeni a svalech (Mouiseddine *et al.*, 2007).

Z kapitoly výše je patrná snaha biologů a inženýrů vyvinout protokoly pro zlepšení cílení léčby pomocí MSCs, což je zásadní pro další vývoj výzkumu jejich použití jako systém pro cílenou dopravu léčiva a k dosažení jejich plného terapeutického potenciálu.

3 Použití MSCs jako buněčně zprostředkovaných systémů pro dopravu léčiv

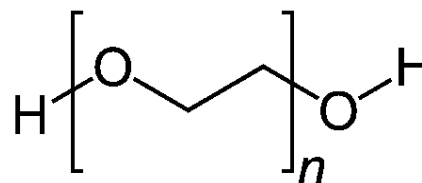
V předchozí kapitole bylo ukázáno, že MSCs dokážou velice efektivně migrovat do požadovaného místa, čímž se otvírají nové možnosti terapií. Tyto terapie mohou využívat celou řadu přístupů, mezi něž patří například nanočástice, genetické modifikace, virové vektory a další.

3.1 Nanočástice

Nanočástice (NPs; z anglického NanoParticles) mohou jako systém pro dopravu léčiv přenášet celou řadu terapeutických agens, kterými mohou být například léčiva, malé peptidy anebo i plazmidová DNA. Jejich výhodou je výroba, která umožňuje přesné nastavení jejich chemických i fyzikálních vlastností, jako je velikost, hydrofobicita, či povrchový náboj.

Chemoterapie a ozařování, často používané metody při léčbě rakoviny, s sebou nesou mnoho vedlejších negativních efektů ovlivňujících život pacienta. Pomocí NPs, do kterých se mohou částice léčiva dostávat například skrze póry, lze dosáhnout mnohem menších systémových cytotoxických účinků *in vivo* nežli u samostatně podaného léčiva, jak bylo dokázáno u léčiva docetaxelu (DOX) (Li *et al.*, 2010). Tyto schopnosti samotných NPs mohou být podpořeny pomocí MSCs. A to díky jejich cílené migraci k místu nádoru, a tím zmenšením systémové cytotoxicity daného agens.

Nanočástice v živém organismu jsou většinou vystaveny silnému tlaku ze strany imunitního systému, především jsou fagocytovány makrofágy. Proces PEGylace hojně využívaný u NPs, spočívá v napojení PEG na povrchové struktury, a vzhledem k tomu, že PEG

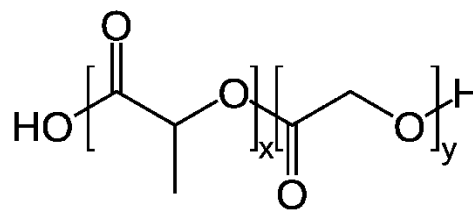


Obrázek 3: Molekula PEG

je molekula hydrofobní a bez náboje (viz obrázek 3), tak se okolo NPs zvětší hydrofobní obal, a tak se zvýší doba retence NPs v organismu a sníží míra fagocytózy makrofágy. V současnosti se ukazuje, že PEGylace má i své negativní dopady v podobě aktivace imunitního systému, a to zvýšením hladin cytokinů (Luo *et al.*, 2017).

3.1.1 Polymerní nanočástice

Jedním z často využívaných typů NPs pro výzkum a přenos léčiv pomocí MSCs jsou NPs vytvořené z polymeru PLGA (z anglického poly(lactic-co-glycolic acid)); viz obrázek 4). Studie využívající nanočástice PLGA naplněné paclitaxelem (Ptx) v



Obrázek 4: Molekula PLGA

krysím *in vivo* modelu ukázala, že NPs mají výbornou schopnost internalizace dostatečného množství léčiva. Ptx-PLGA jsou poté endocytovány do MSCs *in vitro* v kultivačním médiu. Maximální pohlcení bylo prokázáno po 8 hodinách, nicméně pro optimální migrační potenciál je potřeba delší inkubace. Po migraci buněk do gliomu byly MSCs schopné velice efektivně léčivo exocytovat a udržovat stálou hladinu Ptx *in vivo* (Panyam *et al.*, 2002).

Ve studii, kde byly použity fluorescenčně značené NPs (vytvořené pomocí PLGA a PEG) naplněné léčivem DOX, byla sledována míra jejich internalizace do MSCs. Ta měla své maximum po 12 h, kdy v MSCs bylo detekováno více než dvojnásobné množství internalizovaného DOX než u fibroblastů. Tento významný rozdíl předurčuje MSCs jako potenciální vhodné kandidáty na využití jako nosiče NPs. MSCs naplněné NPs byly poté i.v. aplikovány do myši a králíků s nádory plic a po 12 a 24 hodinách byly MSCs stále detekovány pouze v plicích. Sledování NPs ukázalo, že systém MSCs s internalizovanými NPs je asi 4x účinnější nežli podání NPs samostatně. Systém MSCs-NPs-DOX v porovnání se samotnými NPs-DOX, kdy byly jednotlivé dávky léčiva podávány každých pět dní, inhiboval nádorové bujení, ale pouze s osminovým množstvím potřebného léčiva, díky cílené migraci MSCs. A právě díky jejich cílenému putování do plic se jeví tento systém jako účinný buněčně zprostředkovaný systém pro dopravu léčiv pro léčbu rakoviny plic, ale i jiných nemocí plic jako jsou chronické pneumonie a další (Wang *et al.*, 2019).

3.1.2 Magnetické nanočástice

Magnetické NPs mají celou řadu využití v kombinaci s MSCs, například při jejich sledování *in vivo* pomocí magnetické rezonance anebo při cílení migrace těchto buněk přímo na určené místo pomocí magnetického pole.

Ve studii na prasečím modelu, kde autoři používali samostatné NPs složené z elementárního železa a aktivního uhlí, které je schopné adsorbovat terapeutické agens

jako například DOX, měla prasata magnetický disk přiložený ventrálně v orientované poloze. Díky svému složení tyto NPs vykazaly efektivní lokalizaci oproti samostatně podanému DOX (Goodwin *et al.*, 2001).

Možnosti cílené lokalizace magnetických NPs bylo využito ve studii, kde byly MSCs označeny pomocí superparamagnetických nanočástic oxidu železitého (takzvaných SPIONs). MSCs se SPIONs internalizovanými v cytoplasmě byly v *in vitro* modelu úspěšně pomocí přiloženého magnetu donuceny k migraci, a to zejména při menších průtokových rychlostech typických pro vény a kapilární řečiště. Tyto buňky v myším *in vivo* modelu infarktu myokardu byly pomocí magnetu naváděny a v porovnání s kontrolními buňkami neobsahujícími SPIONs vykazovaly magneticky značené téměř třikrát větší retenci v tkáních myokardu (Huang *et al.*, 2013). Tento způsob cílení buněk by se dal využít při celé řadě především subkutánních onemocnění, třeba u melanomů, či rakoviny prsu.

Podobně byly SPIONs endocytovány do MSCs a použity pro terapii hypertermií navozené pomocí střídavého magnetického pole pro inhibici buněčné kultury gliomu *in vitro*. To je umožněno díky migraci MSCs ke kultuře buněk gliomu, kde jsou SPIONs exocytovány MSCs a následně internalizovány gliomovými buňkami. Působením magnetického pole byly SPIONs uvnitř buněk zahřáty a pomocí intracelulární hypertermie byla navozena apoptóza gliomových buněk (Altanerova *et al.*, 2017).

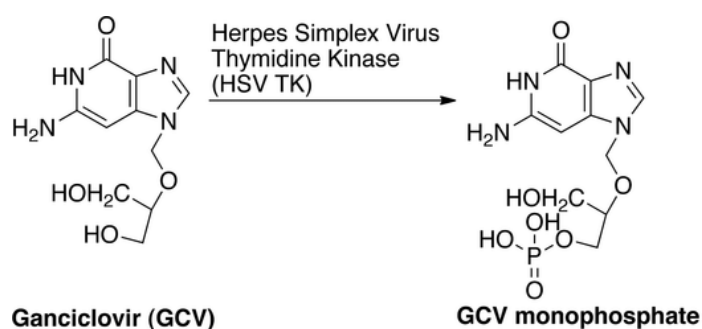
V další studii byly myším s nádory žaludku i.v. aplikovány MSCs s internalizovanými fluorescenčně-značenými magnetickými NPs. Pomocí *in vivo* fluorescenčního zobrazování a magnetické rezonance byla monitorována migrace MSCs-NPs. Díky NPs je toto sledování *in vivo* možné a je tak usnadněno sledování jimi značených MSCs v organizmu a průběh jejich migrace. Po sedmi dnech se fluorescenční signál MSCs začal objevovat a postupně zesilovat v oblasti tumoru, maxima dosáhl 14. den. Tkáň nádoru měla v porovnání s ostatními orgány značně zvýšený fluorescenční signál, který nebyl detekován v žádném jiném orgánu. Migrace do nádoru je tak postupný proces a MSCs prokazatelně preferují migraci do místa tumoru, kde také produkují četné chemokiny. Autoři této studie tak prokazují, že MSCs mohou být vhodnými kandidáty jako vektor pro léčbu. A co více tyto NPs nevykazují žádnou prokazatelnou cytotoxicitu pro MSCs při jejich kultivaci (Ruan *et al.*, 2012).

3.2 Prekurzory léčiv specifické pro tumory

MSCs se mohou také použít jako přenašeče pro specifické prekurzory léčiv, které jsou schopné za konkrétních podmínek přeměny z netoxických prekurzorů na jejich metabolity, a tak selektivně přímo v nádoru působit apoptózu jeho buněk.

3.2.1 Herpes-simplex-virus tymidin kináza

Jedním ze značně diskutovaných postupů, jak přeměnit prekurzor na aktivní toxické agens, je například použití gancicloviru (GCV) spolu s enzymem herpes-simplex-virus tymidin kináza (HSV-TK). HSV-TK má schopnost fosforylovat GCV na toxické agens (viz obrázek 5), které inhibuje DNA polymerázu a indukuje tak apoptózu v buňkách, které nesou tento sebevražedný gen i v okolních buňkách, jimiž mohou být rakovinové buňky. To se nazývá „bystander efekt“. Pro zvýšení efektivity a snížení toxicity GCV byly MSCs geneticky modifikovány genem pro HSV-TK a S-TRAIL (z anglického soluble tumor necrosis factor-related apoptosis). V *in vitro* modelu kultury glioblastomu tímto přístupem bylo možné vyvolat apoptózu cíleně u nádorových buněk a zpomalení progresu nádorového bujení (Martinez-Quintanilla *et al.*, 2013).

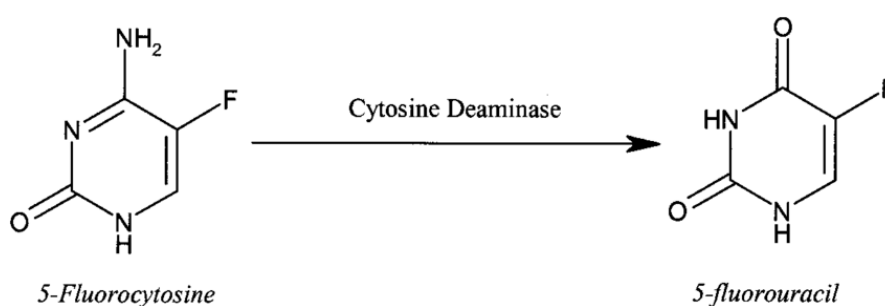


Obrázek 5: Přeměna prekurzoru GCV na toxické agens pomocí HSV-TK (převzato z Singh *et al.*, 2008)

Postup využívající HSV-TK byl vůbec prvním klinickým testem využívajícím geneticky modifikované MSCs. V klinické studii s názvem TREAT-ME1 se šesti pacienty s gastrointestinálním adenokarcinomem byl použit prekurzor GCV společně s MSCs geneticky upravenými pro expresi HSV-TK. Tento klinický test ukázal, že použití geneticky modifikovaných MSCs je bezpečné, a dokonce vyvolává zánětlivou reakci monocytů, a tak podpoří jejich protinádorovou imunitní odpověď (von Einem *et al.*, 2017).

3.2.2 Cytosin deamináza

Dalším ze slibných přístupů aktivace prekursoru léčiva pomocí MSCs je jejich genetická úprava tak, aby exprimovaly enzym cytozin deamináza (CD), který dokáže přeměnit prekursor 5-fluorouracilu na jeho toxický produkt (viz obrázek 6). Vysoká systémová toxicita léčiva 5-fluorouracilu je snížena použitím prekursoru 5-fluorocytosin, který je nesrovnatelně méně toxický než jeho produkt, vzniklý deaminací pomocí CD. Za pomoci této kombinace lze docílit značného „bystander efektu“ a zároveň se tato kombinace již ukázala být bezpečná jak *in vitro* tak v *in vivo* studiích a prokázala svou účinnost pro léčbu celé řady typů rakoviny (Hirschowitz *et al.*, 2008).



Obrázek 6: Přeměna 5-fluorocytosinu na toxický 5-fluorouracil pomocí CD (převzato z Rooseboom *et al.*, 2004)

Přístup využívající prekursoru 5-fluorocytosinu a MSCs transdukovaných pomocí retroviru, tak aby nesly a aktivně exprimovaly CD, byl použit v léčbě adenokarcinomu konečnicku v kultuře i *in vivo* na myším modelu. Díky takto upraveným buňkám byl zastaven růst karcinomu *in vitro* i *in vivo* (Kucerova *et al.*, 2007).

3.3 Onkolytické viry

Onkolytické viry jsou nativní či rekombinantní viry, které jsou schopné indukovat lyzi tumoru, zatímco buňky hostitele téměř neovlivní. To je způsobeno selektivní replikací v buňkách nádoru anebo díky indukci protinádorové odpovědi hostitele. Onkolytické viry zabíjejí rakovinové buňky a přitom uvolňují PAMPs, DAMPs a cytokiny, které poté podporují maturaci antigen prezentujících buněk a aktivují efektorové T-buňky, které zprostředkovávají protinádorovou imunitní odpověď. Mezi onkolytické viry patří celá řada virů a mezi těmi nejvyužívanějšími jsou adenoviry, nebo také virus spalniček (Kaufman *et al.*, 2015).

3.3.1 Adenoviry

Ve studii, kdy byl použit adenovirový vektor Delta-24-RGD (D24RGD) k léčení nádoru vaječníku v myším modelu, porovnávali vědci použití vektoru samotného s použitím MSCs jako vektoru pro daný adenovirus. U adenoviru byl terapeutický účinek již znám, ale jeho systémová toxicita snižuje efektivitu této terapie. MSCs byly infikovány virem D24RGD, který se v nich po infekci nadále mohl množit a byly aplikovány myším intraperitoneálně.

Porovnáním myší s aplikovanými MSCs-D24RGD se skupinou, které byl virus D24RGD aplikován samostatně, se prokázalo, že doba přežívání se u obou případů zvýšila téměř dvojnásobně oproti kontrolní neléčené skupině. Rozdílná je však distribuce virových partikulí, kdy v případě podání pouze viru samotného je jeho distribuce více systémová než u podání viru pomocí MSCs, kdy se virus nešířil v celém těle, ale cíleně v daném místě. Tento rozdíl je zásadní, neboť, jak je zmíněno výše, tento přístup zmenšuje toxicitu viru pro organizmus, která jinak může být až letální (Dembinski *et al.*, 2010).

3.3.2 Virus spalniček

MSCs mohou být také infikovány onkolytickým virem spalniček bez většího vlivu na jejich životaschopnost. Po i.v. aplikaci MSCs infikovaných virem spalniček do myší byla popsána cílená migrace buněk do jater s karcinomem. Tímto způsobem je zajištěna replikace viru přímo na požadovaném místě a tím i zprostředkována inhibice růstu nádoru. Oproti samostatně použitému viru spalniček je virus uvnitř MSCs mnohem lépe chráněn proti imunitní odpovědi hostitele (Ong *et al.*, 2013).

3.4 Genová terapie

Genová terapie skýtá obrovské množství nových terapeutických postupů. Ve spojení s MSCs, které mohou být upraveny tak, aby měly zvýšenou expresi daného agens, se jedná o mocný, a přitom stále velice mladý nástroj léčby celé řady nemocí.

3.4.1 Interferony

3.4.1.1 IFN- α

Jedním z cytokinů, které mají protinádorové účinky jsou interferony (IFN) typu I. IFN- α vykazuje celou škálu protinádorových vlastností, ať už inhibici buněčného dělení,

potlačení angiogeneze v tumoru, indukci apoptózy a aktivaci hostitelské imunitní odpovědi vůči nádoru (Liu *et al.*, 2012).

Myší MSCs byly transdukovány genem pro IFN- α a poté aplikovány i.v. Tyto MSCs cíleně migrovaly do plic k místu metastáze melanomu a zde bez navýšení systémové hladiny IFN- α , dokázaly efektivně inhibovat růst metastází snížením buněčné proliferace, a nádorové vaskulatury a naopak zvýšením apoptózy nádorových buněk (Ren *et al.*, 2008).

3.4.1.2 IFN- β

Již od posledních dvaceti let minulého století je známo, že značná část gliomů nemá přítomný ani jeden funkční gen *IFNA* a *IFNB* (Miyakoshi *et al.*, 1990). Tento fakt byl využit v klinických testech, které prokázaly, že IFN- β má značný inhibiční účinek na růst gliomu (snížení progresu nádoru až o 50 %) (Nehashi *et al.*, 1995).

Lidské MSCs získané z kostní dřeně byly transdukovány pomocí adenovirového vektoru genem pro IFN- β a poté kultivovány s buňkami melanomu a případně podány i.v. athymickým myším. Buňky se úspěšně integrovaly do architektury nádoru, kde dále byly schopné proliferovat. *In vitro* MSCs přímo inhibovaly růst nádorové kultury pomocí produkce IFN- β bez pomoci imunitního systému. Myším v *in vivo* modelu se prodloužila doba přežívání a zmenšila se progresu tumoru (Studený *et al.*, 2002).

Podobných výsledků bylo dosaženo i u myší s rakovinou vaječníku a buňkami podanými intraperitoneálně, kdy u 70 % myší byl nádor kompletně eradikován (Dembinski *et al.*, 2013).

3.4.1.3 IFN- γ

Bylo prokázáno, že i IFN- γ hraje důležitou roli v obraně organismu proti vzniku a progresi nádorových onemocnění. V *in vitro* studii na buňkách myeloidní leukémie kultivovaných s MSCs, které byly transdukovány adenovirovým vektorem genem pro IFN- γ , se tímto postupem indukovalo spuštění programované buněčné smrti a zastavení buněk leukemické linie v G1 fázi buněčného cyklu a tím inhibice progresu onemocnění (Li *et al.*, 2006).

3.4.2 Interleukiny

3.4.2.1 IL-12

IL-12 se ukazuje být velice vhodnou molekulou pro imunoterapeutické protokoly v léčbě nádorových onemocnění. Původně byla tato molekula charakterizována v 90. letech jako cytokin s potenciální schopností aktivace T buněk a NK buněk (Manetti *et al.*, 1993). Principiálně tento cytokin však napomáhá prezentaci tumorových antigenů především pomocí zvýšené exprese MHC molekul I. a II. třídy a Th1 imunitní odpovědi. Tyto efekty jsou spojeny především se schopností IL-12 indukovat produkci IFN- γ (Brunda *et al.*, 1993).

Do MSCs byl pomocí adenovirového vektoru vložen gen pro IL-12. Takto transdukované buňky byly schopné migrovat do tumoru a produkovat lokálně IL-12 a dokázali efektivně potlačit jeho progresi v myším *in vivo* modelu. Zvýšená doba přežití zvířete byla závislá na cytolytické aktivitě NK buněk a zvýšené produkci IFN- γ (Gao *et al.*, 2010).

3.4.2.2 IL-2

Podobný přístup lze využít i použitím IL-2, u něhož je protinádorový účinek velice dobře znám v myším modelu (Iwadate *et al.*, 2001) i při klinických studiích u pacientů s neuroblastomem (Bowman *et al.*, 1998). MSCs transdukované genem pro IL-2 byly schopné prodloužit dobu přežití v krysím *in vivo* modelu a zvýšila se migrace lymfocytů do tkáně gliomu (Nakamura *et al.*, 2004).

3.4.3 TRAIL

TRAIL (z anglického tumor necrosis factor-related-apoptosis-inducing ligand) funguje jako homotrimer a je slabým aktivátorem nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) zesilujícím indukci apoptózy. TRAIL je velice účinný spouštěč apoptózy u buněk většiny prevalentních typů rakovinového bujení a bylo prokázáno, že může účinně bránit vzniku nádoru, či zpomaluje jeho růst, čímž zvyšuje přežívání v myším modelu (Harris *et al.*, 2008).

Lidské MSCs prokázaly absenci takzvaného „death receptoru“ DR4 (TRAIL R1), který slouží jako receptor pro TRAIL a který je však přítomen na buňkách gliomu. A tak MSCs mohou být použity na produkci sekreční formy TRAIL (S-TRAIL) po transdukci

lentivirovým vektorem. Při použití takto upravených MSCs byla detekována apoptóza buněk gliomu navozená sekrecí S-TRAIL pomocí MSCs (Sasportas *et al.*, 2009).

3.4.4 NK4

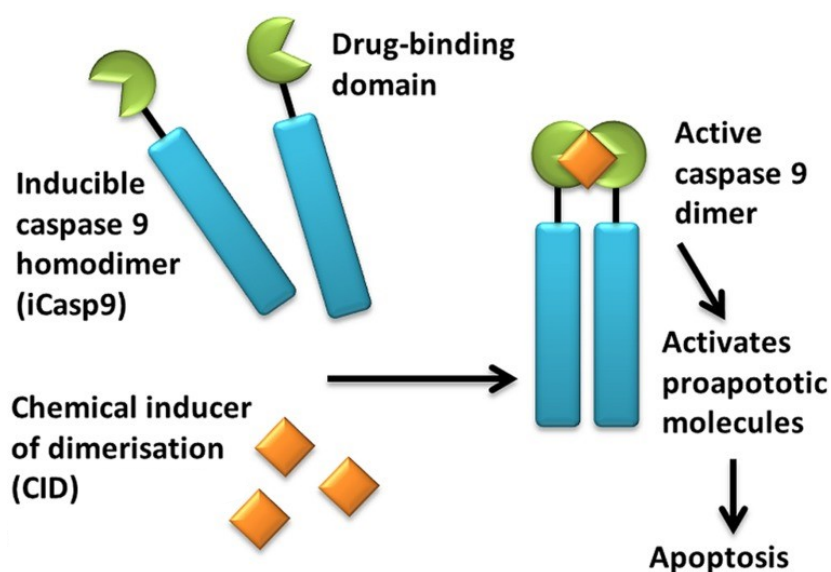
NK4 (antagonista-HGF) je antagonist hepatocytárního růstového faktoru (HGF) ale dokáže i nezávisle fungovat i jako inhibitor angiogeneze a tím zpomalit progresi nádoru (Suzuki *et al.*, 2010).

MSCs transdukované lentivirovým vektorem genem pro NK4, vykázaly cílenou migraci ke kultuře buněk nádoru žaludku a mají schopnost indukce apoptózy nádorových buněk a nekrózy tumoru pomocí inhibice angiogeneze spojené s nádorem (Zhu *et al.*, 2014).

4 Kontroverze při používání kmenových buněk

Ačkoliv MSCs ukazují slibné vlastnosti pro použití v léčbě rakoviny a jiných nemocí, stále okolo nich panuje velká kontroverze. Neboť jen velice málo je známo o chování MSCs *in vivo* zejména při dlouhodobém působení a není stále úplně jasně znám jejich vliv na vývoj nádoru. Některé studie na lidských neupravených MSCs poukazují na jejich tumorogenicitu (Zhu *et al.*, 2006) a některé naopak jejich inhibiční vlastnosti pro růst nádoru, například inhibice pomocí angiogeneze (Otsu *et al.*, 2009) či suprese tumorogenicity jako takové (Qiao *et al.*, 2008).

Ačkoliv bylo provedeno mnoho klinických studií, které neprokázaly negativní vedlejší efekty po podání MSCs, stále nejsou známy plné dopady dlouhodobého působení (roky po aplikaci) těchto buněk v organismu. Navíc někteří autoři tvrdí, že MSCs v organismu přežívají pouze v řádu hodin, či dní (Eggenhofer *et al.*, 2012). Naštěstí systémy pro ochranu před možnými negativními efekty MSCs v těle pacienta již byly popsány. Jedním z nich může být například systém používající inducibilní kaspázu 9 (iCasp9) a specifický chemický dimerizaci indukující faktor (CID), který při nechtěné diferenciaci a růstu MSCs navodí jejich apoptózu do 24 h (viz obrázek 7). MSCs byly transdukovány genem pro iCasp9 bez ztráty svých diferenciačních schopností a poté aplikovány myším. Při podání CID byla aktivována buněčná smrt pomocí iCasp9 velice selektivně pouze u MSCs oproti kontrolní skupině bez genu pro iCasp9, kde bylo přežívání buněk nezměněno (Ramos *et al.*, 2010).



Obrázek 7: Aktivace apoptózy pomocí iCasp9 a CID (převzato z Ramos *et al.*, 2010)

5 Závěr

Kmenové buňky se staly v buněčných terapiích velice populárními vzhledem k jejich vlastnostem a velkému povědomí odborné veřejnosti. Strhují na sebe oprávněnou pozornost, neboť z předchozí rešerše je nasnadě jejich široké spektrum využití a potenciálních přístupů, jak nejenom jejich imunomodulační vlastnosti využít.

Jak jsem shrnul ve své práci, kmenové buňky skýtají obrovský potenciál, a to nejenom při použití v reparativní medicíně. Neboť kmenové buňky se velice snadno izolují a kultivují a vzhledem k jejich nízké imunogenicitě lze pro terapie a výzkum využít i kmenových buněk allogenních. S rostoucími možnostmi novodobých technologií, mezi něž patří i nanotechnologie a genetické inženýrství, rostou i možnosti využití kmenových buněk, jakožto úspěšného agens pro léčbu nejen rakoviny, ale i mnoha dalších onemocnění. Osobně věřím, že nanotechnologie je obor stále velice mladý, o to však slibnější i co se využití v medicíně týče, neboť se jedná o metodu s velice širokým záběrem využitelnosti. A pokud se podaří dostat nanotechnologie do běžného využití, tak i metodu s velice rychlou a snadnou přípravou s malou ekonomickou náročností. To se může týkat nanočástic, které slouží jako vektor pro dopravu léčiva, anebo nanočástic, které nám usnadní sledování migrace či distribuci léčiva v živém organismu. Další částečně kontroverzní metodikou je genetická úprava kmenových buněk, díky níž získávají své potřebné vlastnosti pro využití u některých postupů. Ačkoliv se jedná o metodu již velice často využívanou a prozatím nebyly zjištěny žádné její negativní efekty, pravdou zůstává, že genetické úpravy mohou mít nám zatím neznámé důsledky.

Stále však zůstává mnoho neznámých u terapií spojených s použitím kmenových buněk. Nedostatečné poznatky jsou zejména na poli molekulárních mechanismů jejich migračních schopností a druhou velkou neznámou se jeví jejich vlastnosti coby dlouhodobého činitele v organismu.

To vše a mnohem více zbývá objevit, aby se kmenové buňky mohly jednoho dne těšit na výsluní jako dostupný a velice úspěšný imunoterapeutický prostředek léčby nejrůznějších nemocí.

6 Seznam literatury

Altanerova, U. et al. (2017) 'Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia', *International Journal of Nanomedicine*, 12, pp. 7923–7936. doi: 10.2147/IJN.S145096.

- * Becker, A. De and Riet, I. Van (2016) 'Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?', *World Journal of Stem Cells*, 8(3), p. 73. doi: 10.4252/wjsc.v8.i3.73.

Bowman, L. et al. (1998) 'IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma.', *Blood*, 92(6), pp. 1941–1949. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731051> (Accessed: 31 March 2019).

Brunda, M. J. et al. (1993) 'Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors.', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 178(4), pp. 1223–1230. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8104230> (Accessed: 31 March 2019).

Butcher, E. C. and Picker, L. J. (1996) 'Lymphocyte Homing and Homeostasis on JSTOR', *Science*, 272(5258), pp. 60–66.

- * Corradetti, B. and Ferrari, M. (2016) 'Nanotechnology for mesenchymal stem cell therapies', *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 240, pp. 242–250. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.042.

Dembinski, J. L. et al. (2010) 'Reduction of nontarget infection and systemic toxicity by targeted delivery of conditionally replicating viruses transported in mesenchymal stem cells.', *Cancer gene therapy*. NIH Public Access, 17(4), pp. 289–297. doi: 10.1038/cgt.2009.67.

Dembinski, J. L. et al. (2013) 'Tumor stroma engraftment of gene-modified mesenchymal stem cells as anti-tumor therapy against ovarian cancer', *Cytotherapy*, 15(1), p. 20–32.e2. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.10.003.

* Označuje review

* Dominici, M. et al. (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.

Eggenhofer, E. et al. (2012) 'Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion', *Frontiers in Immunology*. *Frontiers*, 3, p. 297. doi: 10.3389/fimmu.2012.00297.

von Einem, J. C. et al. (2017) 'Treatment of advanced gastrointestinal cancer with genetically modified autologous mesenchymal stem cells - TREAT-ME-1 - a phase I, first in human, first in class trial', *Oncotarget*, 8(46), pp. 80156–80166. doi: 10.18632/oncotarget.20964.

Gao, P. et al. (2010) 'Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma', *Cancer Letters*, 290(2), pp. 157–166. doi: 10.1016/j.canlet.2009.08.031.

Goodwin, S. C. et al. (2001) Single-Dose Toxicity Study of Hepatic Intra-arterial Infusion of Doxorubicin Coupled to a Novel Magnetically Targeted Drug Carrier. Available at: https://watermark.silverchair.com/060177.pdf?token=AQECAHi208BE490oan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAkQwggJABgkqhkiG9w0BBwagggIxMIICLQIBADCCAIYGCsqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMZT-wzkRobigNMPHIAgEQgIIB91R1S0a5-xe_7kal4QgubcbMh-5lQ8k_qWcbjGMNQ7Hhu8G5 (Accessed: 20 March 2019).

Harris, L. et al. (2008) 'Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 104(2), pp. 155–162. doi: 10.1172/jci6926.

Hirschowitz, E. A. et al. (2008) 'In Vivo Adenovirus-Mediated Gene Transfer of the Escherichia coli Cytosine Deaminase Gene to Human Colon Carcinoma-Derived Tumors Induces Chemosensitivity to 5-Fluorocytosine', *Human Gene Therapy*, 6(8), pp. 1055–1063. doi: 10.1089/hum.1995.6.8-1055.

* Označuje review

Huang, Z. et al. (2013) 'Magnetic targeting enhances retrograde cell retention in a rat model of myocardial infarction', *Stem Cell Research and Therapy*, 4(6). doi: 10.1186/scrt360.

Ihler, G. M., Glew, R. H. and Schnure, F. W. (1973) 'Enzyme loading of erythrocytes.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(9), pp. 2663–2666. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4354859> (Accessed: 29 April 2019).

Iwadate, Y. et al. (2001) 'Induction of immunity in peripheral tissues combined with intracerebral transplantation of interleukin-2-producing cells eliminates established brain tumors.', *Cancer research*, 61(24), pp. 8769–8774. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751397> (Accessed: 31 March 2019).

- * Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J. and Zloza, A. (2015) 'Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs', *Nature Reviews Drug Discovery*, pp. 642–662. doi: 10.1038/nrd4663.
- * Krueger, T. E. G. et al. (2018) 'Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise', *Stem Cells Translational Medicine*, 7(9), pp. 651–663. doi: 10.1002/sctm.18-0024.

Kucerova, L. et al. (2007) 'Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy', *Cancer Research*, 67(13), pp. 6304–6313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4024.

Kumar, S. and Ponnazhagan, S. (2007) 'Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic $\alpha 4$ integrin expression', *The FASEB Journal*, 21(14), pp. 3917–3927. doi: 10.1096/fj.07-8275com.

Li, L. et al. (2010) 'In vivo delivery of silica nanorattle encapsulated docetaxel for liver cancer therapy with low toxicity and high efficacy', *ACS Nano*, 4(11), pp. 6874–6882. doi: 10.1021/nn100918a.

* Označuje review

Li, X. et al. (2006) 'In vitro effect of adenovirus-mediated human Gamma Interferon gene transfer into human mesenchymal stem cells for chronic myelogenous leukemia', *Hematological Oncology*, 24(3), pp. 151–158. doi: 10.1002/hon.779.

Liu, X. et al. (2012) 'Antitumor Effects of Interferon-Alpha on Cell Growth and Metastasis in Human Nasopharyngeal Carcinoma', *Current Cancer Drug Targets*, 12(5), pp. 561–570. doi: 10.2174/156800912800673293.

Luo, N. et al. (2017) 'PEGylated graphene oxide elicits strong immunological responses despite surface passivation', *Nature Communications*, 8, p. 14537. doi: 10.1038/ncomms14537.

Majumdar, M. K. et al. (1998) 'Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells', *Journal of Cellular Physiology*, 176(1), pp. 57–66. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<57::AID-JCP7>3.0.CO;2-7.

Manetti, R. et al. (1993) 'Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 177(4), pp. 1199–1204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8096238> (Accessed: 31 March 2019).

Martinez-Quintanilla, J. et al. (2013) 'Therapeutic efficacy and fate of bimodal engineered stem cells in malignant brain tumors', *Stem Cells*. NIH Public Access, 31(8), pp. 1706–1714. doi: 10.1002/stem.1355.

Miyakoshi, J. et al. (1990) 'Absence of IFNA and IFNB genes from human malignant glioma cell lines and lack of correlation with cellular sensitivity to interferons.', *Cancer research*, 50(2), pp. 278–283. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2295067> (Accessed: 26 March 2019).

Mouiseddine, M. et al. (2007) 'Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model', in *British Journal of Radiology*, pp. 49–55. doi: 10.1259/bjr/25927054.

* Označuje review

Nakamura, K. et al. (2004) 'Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model', *Gene Therapy*, 11(14), pp. 1155–1164. doi: 10.1038/sj.gt.3302276.

Nehashi, K. et al. (1995) 'Growth inhibition of human glioma cells by superinduced human interferon-beta.', *Neurologia medico-chirurgica*, 35(10), pp. 719–722. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8532125> (Accessed: 29 April 2019).

Ong, H. T. et al. (2013) 'Systemically delivered measles virus-infected mesenchymal stem cells can evade host immunity to inhibit liver cancer growth', *Journal of Hepatology*, 59(5), pp. 999–1006. doi: 10.1016/j.jhep.2013.07.010.

Otsu, K. et al. (2009) 'Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells'. doi: 10.1182/blood.

- * Pang, L. et al. (2017) 'A novel strategy to achieve effective drug delivery: Exploit cells as carrier combined with nanoparticles', *Drug Delivery*, 24(1), pp. 83–91. doi: 10.1080/10717544.2016.1230903.

Panyam, J. et al. (2002) 'Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10), pp. 1217–1226. doi: 10.1096/fj.02-0088com.

Qiao, L. et al. (2008) 'Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 18(4), pp. 500–507. doi: 10.1038/cr.2008.40.

Ramos, C. A. et al. (2010) 'An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies.', *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(6), pp. 1107–1115. doi: 10.1002/stem.433.

Ren, C. et al. (2008) 'Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model.', *Stem cells (Dayton, Ohio)*. NIH Public Access, 26(9), pp. 2332–2338. doi: 10.1634/stemcells.2008-0084.

* Označuje review

Ruan, J. et al. (2012) 'Fluorescent magnetic nanoparticle-labeled mesenchymal stem cells for targeted imaging and hyperthermia therapy of in vivo gastric cancer', *Nanoscale Research Letters*, 7, p. 1. doi: 10.1186/1556-276X-7-309.

Sasportas, L. S. et al. (2009) 'Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), pp. 4822–4827. doi: 10.1073/pnas.0806647106.

Sato, H. et al. (2005) 'Epidermal growth factor receptor-transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors', *Cancer Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 12(9), pp. 757–768. doi: 10.1038/sj.cgt.7700827.

Shi, M. et al. (2007) 'Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: Role in homing efficiency in NOD/SCID mice', *Haematologica*, 92(7), pp. 897–904. doi: 10.3324/haematol.10669.

Singh, Y., Palombo, M. and Sinko, P. (2008) 'Recent Trends in Targeted Anticancer Prodrug and Conjugate Design', *Current Medicinal Chemistry*, 15(18), pp. 1802–1826. doi: 10.2174/092986708785132997.

Studený, M. et al. (2002) 'Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- β delivery into tumors', *Cancer Research*, 62(13), pp. 3603–3608. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/62/13/3603.full.pdf> (Accessed: 18 March 2019).

Suzuki, Y. et al. (2010) 'Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma', *International Journal of Cancer*, 127(8), pp. 1948–1957. doi: 10.1002/ijc.25197.

Tatsumi, K. et al. (2013) 'Tissue factor triggers procoagulation in transplanted mesenchymal stem cells leading to thromboembolism', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 431(2), pp. 203–209. doi: 10.1016/J.BBRC.2012.12.134.

* Označuje review

Toma, C. et al. (2009) 'Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: In vivo observations of cell kinetics', *Circulation Research*, 104(3), pp. 398–402. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.187724.

Wang, X. et al. (2019) 'Efficient lung cancer-targeted drug delivery via a nanoparticle/MSC system', *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(1), pp. 167–176. doi: 10.1016/j.apsb.2018.08.006.

- * Weiss, J. M. et al. (2007) 'Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(11), pp. 1705–1721. doi: 10.1517/14712598.7.11.1705.

Won, Y. W., Patel, A. N. and Bull, D. A. (2014) 'Cell surface engineering to enhance mesenchymal stem cell migration toward an SDF-1 gradient', *Biomaterials*. Elsevier, 35(21), pp. 5627–5635. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.070.

- * Yagi, H. and Kitagawa, Y. (2013) 'The role of mesenchymal stem cells in cancer development.', *Frontiers in genetics*. Frontiers Media SA, 4(261), pp. 1–6. doi: 10.3389/fgene.2013.00261.

Yukawa, H. et al. (2012) 'Monitoring transplanted adipose tissue-derived stem cells combined with heparin in the liver by fluorescence imaging using quantum dots', *Biomaterials*. Elsevier, 33(7), pp. 2177–2186. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.009.

Zhu, W. et al. (2006) 'Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo', *Experimental and Molecular Pathology*, 80(3), pp. 267–274. doi: 10.1016/j.yexmp.2005.07.004.

Zhu, Y. et al. (2014) 'Mesenchymal stem cell-based NK4 gene therapy in nude mice bearing gastric cancer xenografts', *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Press, 8, pp. 2449–2462. doi: 10.2147/DDDT.S71466.

* Označuje review

7 Seznam obrázků

Obrázek 1: Krueger, T. E. G. et al. (2018) 'Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise', *Stem Cells Translational Medicine*, 7(9), pp. 651–663. doi: 10.1002/sctm.18-0024.

Obrázek 2: Krueger, T. E. G. et al. (2018) 'Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise', *Stem Cells Translational Medicine*, 7(9), pp. 651–663. doi: 10.1002/sctm.18-0024.

Obrázek 3: Jü – Vlastní dílo, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=38464529>

Obrázek 4: Fvasconcellos (talk · contribs) - Vector version of w:Image:PLGA.jpg, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4596206>

Obrázek 5: Singh, Y., Palombo, M. and Sinko, P. (2008) 'Recent Trends in Targeted Anticancer Prodrug and Conjugate Design', *Current Medicinal Chemistry*, 15(18), pp. 1802–1826. doi: 10.2174/092986708785132997.

Obrázek 6: Rooseboom, M. (2004) 'Enzyme-Catalyzed Activation of Anticancer Prodrugs', *Pharmacological Reviews*, 56(1), pp. 53–102. doi: 10.1124/pr.56.1.3.

Obrázek 7: Ramos, C. A. et al. (2010) 'An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies.', *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(6), pp. 1107–1115. doi: 10.1002/stem.433.