

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Imunologie



Bc. Markéta Fráňová

Modulace mitochondriálního přenosu ovlivněním mezenchymálních kmenových buněk
Modulation of mitochondrial transfer by influencing mesenchymal stem cells

Diplomová práce

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

Praha, 2024

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. za vedení práce, velkou vstřícnost, trpělivost a cenné rady. Dále všem členům Laboratoře imunoregulací za veškerý čas, který mi věnovali, pomoc s experimentální prací a podporu. Nemalé díky patří také mé rodině a přátelům, kteří mě během studia a psaní práce velmi podporovali.

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, 29.04.2024

Markéta Fráňová

Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells – MSCs) mají schopnost modulovat imunitní odpověď. K působení na imunitní buňky využívají řadu mechanismů. Jedním z nich je mitochondriální přenos. Přijetí mitochondrií od MSCs indukuje v imunitních buňkách metabolické změny, a podporuje tím jejich přesmyk na protizánětlivý fenotyp. Díky svým vlastnostem mají MSCs potenciál pro využití v terapiích, například v léčbě autoimunitních onemocnění. Problémem terapií využívajících MSCs je jejich nízká účinnost, která je způsobena především vysokou úmrtností kmenových buněk po transplantaci. Aby bylo dosaženo alespoň nějakého účinku, je potřeba velkého počtu buněk, který lze získat pouze expanzí *in vitro*. Avšak dlouhodobá kultivace má negativní vliv na MSCs a jejich imunomodulační působení. Podpoření funkce MSCs by mohlo vést ke zvýšení účinnosti terapií. Cílem této práce bylo zjistit, zda lze stimulací MSCs vybranými faktory modulovat mitochondriální přenos.

MSCs byly ovlivněny rapamycinem, růstovým faktorem podobným inzulinu 1 (insulin-like growth factor 1 – IGF-1), interferonem gama, nebo oligomycinem a následně byl zkoumán vliv těchto faktorů na mitochondrie a jejich přenos do imunitních buněk, metabolismus a imunomodulační působení MSCs. Ukázali jsme, že stimulace MSCs IGF-1, nebo oligomycinem vede ke zvýšení přenosu mitochondrií do imunitních buněk a že mitochondrie jsou preferenčně předávány aktivovaným buňkám s prozánětlivým fenotypem. Imunosupresivní účinky MSCs na T-lymfocyty zůstávají po stimulaci IGF-1, nebo oligomycinem zachovány.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, imunitní buňky, mitochondrie, metabolismus, mitofagie, rapamycin, růstový faktor podobný inzulinu 1, interferon gama, oligomycin

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have the ability to modulate the immune response. They use several mechanisms to affect the function of immune cells, and mitochondrial transfer is one of them. Receiving mitochondria from MSCs induces metabolic changes in immune cells, thereby promoting their shift to an anti-inflammatory phenotype. Due to their properties, MSCs have a potential to be used in therapies, for example in a treatment of autoimmune diseases. The problem of MSCs-based therapies is their low efficacy, mainly due to the high mortality of stem cells after transplantation. In order to achieve at least some effect, the large number of cells is needed for application. The required number of cells can be obtained only by *in vitro* expansion. However, a long-term culture has a negative impact on MSCs and their immunomodulatory properties. Enhancing MSCs function could increase the efficacy of MSCs-based therapies. The aim of this thesis was to determine whether mitochondrial transfer can be modulated by stimulation of MSCs with selected factors.

MSCs were treated with rapamycin, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), interferon gamma, or oligomycin. Then the effect of these factors on mitochondria and their transfer to immune cells, metabolism, and immunomodulatory properties of MSCs was analyzed. We showed that stimulation of MSCs with IGF-1, or oligomycin leads to increased mitochondrial transfer to immune cells and that mitochondria are preferentially transferred to activated immune cells with a pro-inflammatory phenotype. The immunosuppressive effects of MSCs on T cells are maintained after stimulation of cells with IGF-1, or oligomycin.

Key words: mesenchymal stem cells, immune cells, mitochondria, metabolism, mitophagy, rapamycin, insulin-like growth factor 1, interferon gamma, oligomycin

Obsah

Seznam použitých zkratk
1 Úvod	1
2 Literární přehled	2
2.1 Charakterizace mezenchymálních kmenových buněk	2
2.1.1 Imunomodulační funkce	3
2.2 Terapeutické využití mezenchymálních kmenových buněk	5
2.2.1 Faktory ovlivňující účinnost terapií	5
2.3 Mitochondrie mezenchymálních kmenových buněk	7
2.3.1 Mitochondriální dynamika	7
2.3.2 Mitofagie a biogeneze mitochondrií	8
2.3.3 Reaktivní formy kyslíku	9
2.4 Přenos mitochondrií z mezenchymálních kmenových buněk	10
2.4.1 Mechanismy mitochondriálního přenosu	11
2.4.1.1 Tunelové nanotrubičky	12
2.4.1.2 Extracelulární váčky	12
2.4.2 Přenos mitochondrií do imunitních buněk	13
2.4.2.1 Makrofágy	13
2.4.2.2 Lymfocyty	14
3 Cíle práce	16
4 Materiály a metody	17
4.1 Zvířata	17
4.2 Média	17
4.3 Roztoky	17
4.4 Technické vybavení	18
4.5 Software	18
4.6 Izolace a kultivace MSCs	19
4.7 Ovlivnění MSCs	19
4.8 Analýza MSCs	21
4.8.1 Průtoková cytometrie	21
4.8.1.1 Fenotypizace MSCs	21
4.8.1.2 Měření mitofagie	22
4.8.1.3 Měření mitochondriální masy a membránového potenciálu mitochondrií	22
4.8.1.4 Měření ROS a NO	23
4.8.2 Fluorescenční mikroskopie	24
4.8.3 WST test	25
4.8.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	25
4.8.4.1 Izolace RNA	25
4.8.4.2 Reverzní transkripce	26

4.8.4.3	Měření qPCR.....	26
4.8.5	Měření metabolické aktivity s využitím Seahorse analyzáru.....	27
4.8.5.1	BCA metoda.....	28
4.9	Analýza splenocytů.....	28
4.9.1	Izolace splenocytů.....	28
4.9.2	Kokultivace MSCs a splenocytů.....	29
4.9.3	Průtoková cytometrie.....	29
4.9.3.1	Měření přenosu mitochondrií z MSCs do splenocytů.....	29
4.9.3.2	Měření intracelulárních cytokinů a transkripčních faktorů.....	30
4.10	Statistická analýza.....	32
5	Výsledky.....	33
5.1	První část.....	33
5.1.1	Fenotypizace MSCs.....	33
5.1.2	Mitochondriální přenos z MSCs do splenocytů.....	34
5.1.3	Uspořádání mitochondrií v MSCs.....	35
5.1.4	Mitofagie v MSCs.....	37
5.1.5	Mitochondriální masa a membránový potenciál mitochondrií MSCs.....	37
5.1.6	Mitochondriální dynamika u MSCs.....	38
5.1.7	Metabolismus MSCs.....	39
5.1.8	Produkce ROS a NO MSCs.....	40
5.1.9	Shrnutí.....	41
5.2	Druhá část.....	42
5.2.1	Mitochondriální přenos z MSCs do splenocytů.....	42
5.2.2	Uspořádání mitochondrií v MSCs.....	43
5.2.3	Mitochondriální dynamika, autofagie a mitofagie v MSCs.....	44
5.2.4	Metabolismus MSCs.....	46
5.2.5	Analýza fenotypu splenocytů po kokultivaci s MSCs.....	47
5.2.5.1	Přežívání splenocytů.....	49
5.2.5.2	Aktivace T-lymfocytů.....	51
5.2.5.3	Exprese transkripčních faktorů u T-lymfocytů.....	52
5.2.5.4	Stanovení intracelulárních cytokinů u T-lymfocytů.....	54
6	Diskuze.....	56
7	Závěr.....	64
8	Seznam použité literatury.....	65

Seznam použitých zkratk

ATP	Adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
Breg	Regulační B-lymfocyty (regulatory B cells)
Drp1	Protein příbuzný dynaminu 1 (dynamin-related protein 1)
EV	Extracelulární váčky (extracellular vesicles)
FBS	Fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
GJC	Těsné spoje (gap junctions)
GVHD	Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease)
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenáza (indolamine 2,3-dioxygenase)
IFN γ	Interferon gama (interferon gamma)
IGF-1	Růstový faktor podobný inzulinu 1 (insulin-like growth factor 1)
IL	Interleukin (interleukin)
iPSCs	Indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)
Mfn1	Mitofusin 1 (mitofusin 1)
Mfn2	Mitofusin 2 (mitofusin 2)
MSCs	Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
mtDNA	Mitochondriální DNA (mitochondrial DNA)
NO	Oxid dusnatý (nitric oxide)
Opa1	Protein optické atrofie 1 (optic atrophy 1)
PBS	Fosfátový pufr (phosphate saline buffer)
PD-1	Receptor programované buněčné smrti 1 (programmed cell death 1)
PGC-1 α	PPAR γ koaktivátor 1 alfa (PPAR γ coactivator 1 alpha)
PINK1	PTEN-indukovaná protein kináza 1 (PTEN-induced kinase 1)
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
TGF- β	Transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
TLR	Toll-like receptor (Toll-like receptor)
TNF α	Faktor nádorové nekrózy alfa (tumor necrosis factor alpha)
TNT	Tunelové nanotrubičky (tunneling nanotubes)
Treg	Regulační T-lymfocyty (regulatory T cells)

1 Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells – MSCs) jsou multipotentní buňky vyskytující se v různých tkáních, kde se podílejí na udržování homeostázy. Mimo jejich schopnost diferencovat do mnoha buněčných typů, MSCs mají imunomodulační, antiapoptotické, proangiogenní a antioxidační účinky. Působení na okolní buňky je zprostředkováno produkcí různých cytokinů, růstových faktorů a extracelulárních váčků (extracellular vesicles – EV), interakcí prostřednictvím povrchových molekul nebo přenosem mitochondrií (shrnutí v: Fan et al. 2020). A právě mitochondriím a jejich přenosu bude věnována pozornost v této diplomové práci.

Díky svým regeneračním a imunomodulačním vlastnostem mají MSCs potenciál pro využití v medicíně v léčbě řady poranění a autoimunitních onemocnění. Avšak klinické studie testující bezpečnost a účinnost terapií využívajících MSCs nedosáhly požadovaných výsledků. Nekonzistentní výsledky klinických studií jsou způsobeny vysokou heterogenitou MSCs. Zdroj MSCs, doba a podmínky kultivace, všechny tyto faktory ovlivňují fenotyp MSCs, a tedy i jejich terapeutický efekt (shrnutí v: Fan et al. 2020). Dalším problémem je vysoká úmrtnost transplantovaných MSCs, jež je způsobena především neschopností MSCs vypořádat se s velkým metabolickým stresem, který buňky zažívají po přenosu z kultivačních podmínek do ischemického prostředí poškozené tkáně (shrnutí v: Salazar-Noratto et al. 2020). Cílem vědecké komunity je tyto problémy vyřešit. Výzkumné týmy zabývající se problematikou MSCs zaměřily svou pozornost na modulaci kultivačních podmínek s cílem podpořit přežívání kmenových buněk po transplantaci. Dalším zkoumaným přístupem je přímé ovlivnění MSCs vedoucí k podpoření jejich funkce (shrnutí v: Fan et al. 2020).

Tato práce se zabývá vlivem rapamycinu, růstového faktoru podobného inzulinu 1 (insulin-like growth factor 1 – IGF-1), interferonu gama (IFN γ) a oligomycinu na MSCs a jejich schopnost předávat mitochondrie imunitním buňkám. Dále pak popisuje změny fenotypu imunitních buněk indukované působením MSCs.

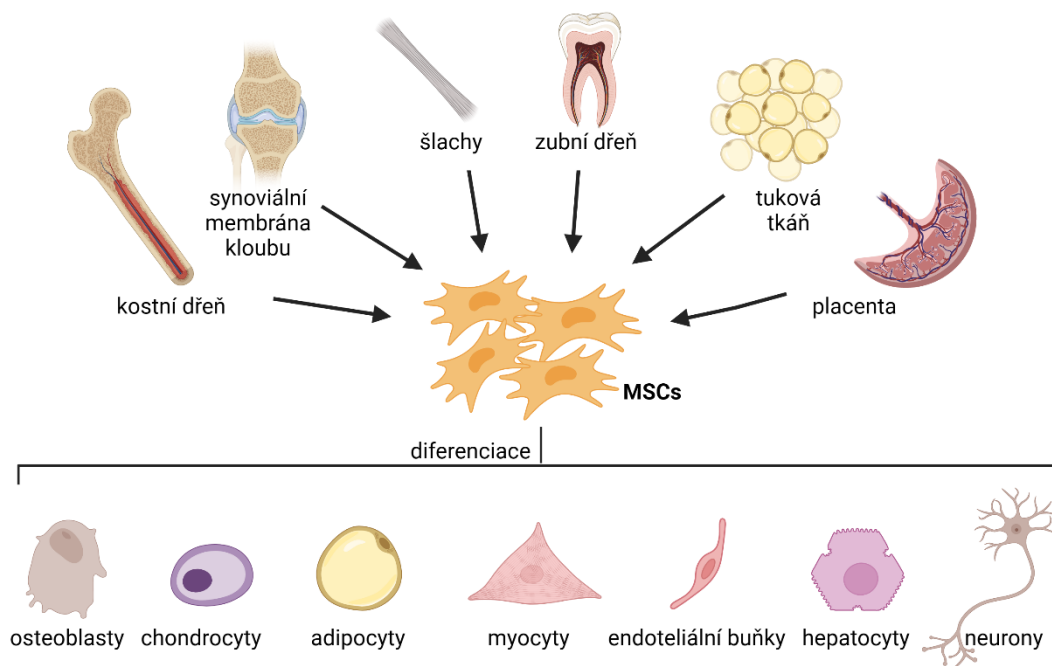
2 Literární přehled

2.1 Charakterizace mezenchymálních kmenových buněk

MSCs byly poprvé popsány před více než 50 lety. Friedenstein a kolegové je definovali jako v kostní dřeni sídlící buňky schopné adherovat na plastový povrch, proliferovat a diferencovat do buněk kostní tkáně (Friedenstein et al., 1970). V dnešní době je známo, že kostní dřev není jediným místem výskytu MSCs. MSCs se nacházejí téměř ve všech tkáních, kde sídlí v nikách kmenových buněk lokalizovaných kolem cév (Pagella et al., 2021). Podařilo se je izolovat z tukové tkáně, zubní dřevě, synoviální membrány kloubu, šlach, placenty či pupečnickové krve (obrázek 1) (De Bari et al., 2001; Lee et al., 2004; Miao et al., 2006; Pierdomenico et al., 2005; Salingcarnboriboon et al., 2003; Zuk et al., 2001). MSCs lze získat také diferenciací indukovaných pluripotentních kmenových buněk (induced pluripotent stem cells – iPSCs). Takto získané MSCs vykazují vyšší proliferační kapacitu. Jejich vlastnosti jsou ale ovlivněny vlastnostmi buňky, z níž byla iPSCs vytvořena (Lee et al., 2023).

Jelikož nebyl objeven žádný specifický povrchový znak pro MSCs, který by umožnil jejich snadnou identifikaci, byla roku 2006 stanovena minimální kritéria pro charakterizaci MSCs. Dle těchto kritérií lze buňku charakterizovat jako MSCs, pokud je adherentní k plastu, diferencuje *in vitro* na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty a exprimuje na svém povrchu molekuly CD105, CD90 a CD73 a naopak je negativní na CD45, CD34, CD14, CD19 a CD11b (Dominici et al., 2006). Míra exprese jednotlivých povrchových znaků se však může lišit u MSCs izolovaných z různých tkání. Co se diferenciaci týče, MSCs mohou upřednostňovat diferenciaci na určitý buněčný typ v závislosti na jejich původu. Jako příklad lze uvést porovnání MSCs izolovaných z kostní dřevě a tukové tkáně, z něhož vyplývá, že MSCs z kostní dřevě vykazují vyšší osteogenní a chondrogenní potenciál, zatímco MSCs z tukové tkáně upřednostňují diferenciaci na adipocyty (Mohamed-Ahmed et al., 2018). Diferenciační potenciál MSCs (obrázek 1) není omezen pouze na osteoblasty, adipocyty a chondrocyty. Za přítomnosti specifických faktorů mohou dát vzniknout také neuronům, kardiomyocytům, hepatocytům či endoteliálním buňkám (Bae et al., 2011; Der Lee et al., 2004; Shen et al., 2017; Wang et al., 2018).

Z důvodu vysoké heterogenity MSCs bylo vydáno doporučení, aby se kromě splnění minimálních kritérií testovala také funkce MSCs, což zahrnuje například analýzu sekretomu či měření jejich imunomodulačního potenciálu (Viswanathan et al., 2019).



Obrázek 1: Zdroje a diferenciální potenciál MSCs; vlastní tvorba (vytvořeno v: BioRender.com)

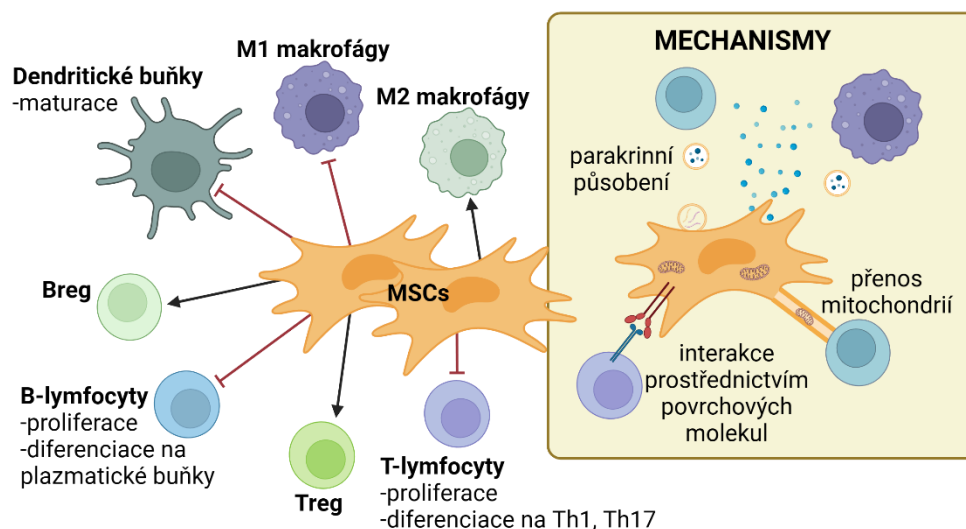
2.1.1 Imunomodulační funkce

Jednou z významných funkcí MSCs je jejich schopnost modulovat imunitní systém (obrázek 2). MSCs mají vliv na buňky přirozené i adaptivní imunity. Jejich působení je především imunosupresivní, podporují tedy diferenciaci a působení buněk s protizánětlivých účinkem, jako jsou regulační T-lymfocyty (regulatory T cells – Treg), regulační B-lymfocyty (regulatory B cells – Breg) (Park et al., 2015) a M2 makrofágy (Liu et al., 2019). Oproti tomu proliferace T-lymfocytů a B-lymfocytů i jejich diferenciaci na Th1, Th17 a plazmatické buňky je v přítomnosti MSCs potlačena (Park et al., 2015). Stejně tak je potlačena polarizace makrofágů na prozánětlivý M1 fenotyp (Liu et al., 2019).

Komunikaci mezi MSCs a imunitními buňkami zprostředkovává řada mechanismů (shrnutí v: Fan et al. 2020). Zde jsou popsány tři z nich, a to interakce prostřednictvím povrchových molekul, parakrinní aktivita a přenos mitochondrií. Každá buňka má na svém povrchu několik různých typů povrchových molekul, z nichž některé fungují jako receptory. Ty po rozpoznání ligandu spouštějí signalizační dráhy vedoucí ke změně buněčných procesů. Jedním z příkladů je Fas receptor na povrchu T-lymfocytů, který rozpoznává Fas ligand na povrchu MSCs. Tato interakce vede ke spuštění drah indukujících apoptózu T-lymfocytů. Apoptotická tělíska jsou fagocytována makrofágy. Ty v důsledku toho zvýší produkci transformujícího růstového faktoru beta (transforming growth factor beta – TGF- β), čímž

podporují vznik Treg (Akiyama et al., 2012). Dalším příkladem je receptor programované buněčné smrti 1 (programmed cell death 1 – PD-1) na povrchu T-lymfocytů. Interakce receptoru PD-1 s jeho ligandem, jehož exprese na povrchu MSCs se po setkání s T-lymfocyty zvyšuje, se podílí na indukci Treg (Azevedo et al., 2020). Co se parakrinní aktivity týče, MSCs produkují různé rozpustné faktory či EV, a ovlivňují tak imunitní buňky ve svém okolí. Rozpustné faktory produkované MSCs zahrnují například cytokiny TGF- β a interleukin (IL)-6, chemokiny CCL2 a CXCL12, hepatocytární růstový faktor, oxid dusnatý (nitric oxide – NO) či indolamin 2,3-dioxygenázu (indolamine 2,3-dioxygenase – IDO) (Giri et al., 2020; Liu et al., 2019; Ren et al., 2008; van Buul et al., 2012). EV produkované MSCs mohou obsahovat výše zmíněné rozpustné faktory nebo mikroRNA. Jelikož jsou váčky obaleny membránou, mohou na svém povrchu nést povrchové molekuly, například již zmíněný ligand receptoru PD-1, a interagovat tak s receptory na imunitních buňkách. Všechny tyto molekuly přenášené EV přispívají k indukci imunosuprese (Kim et al., 2020; Li et al., 2021). Produkce EV je také jeden z mechanismů, který se uplatňuje v přenosu mitochondrií. Přenos mitochondrií se podílí na imunomodulaci tím, že indukuje metabolické změny v recipientních buňkách (Morrison et al., 2017). Jeho detailnějšímu popisu je v této práci věnována samostatná kapitola. Imunomodulační účinky izolovaných EV odvozených od MSCs přitáhly pozornost vědců. V současné době probíhá několik klinických studií testujících jejich využití v léčbě jako alternativu buněčné terapie založené na MSCs (zdroj: [MSC-EVs | Card Results | ClinicalTrials.gov](#)).

V posledních letech bylo publikováno několik studií poukazujících na klíčovou roli metabolismu v regulaci funkcí MSCs. Příkladem je práce Contreras-Lopeza a kolegů, která popisuje zvýšení imunosupresivní funkce MSCs po ovlivnění oligomycinem, inhibitorem ATP syntázy, jenž narušuje funkci mitochondrií a podporuje přechod buněk na glykolýzu (Contreras-Lopez et al., 2020). Běžně se k indukci imunomodulačního působení MSCs používají prozánětlivé cytokiny, konkrétně IFN γ a faktor nádorové nekrózy alfa (tumor necrosis factor alpha – TNF α). IFN γ a TNF α mimikují prostředí zánětu a podporují uvolňování imunosupresivních faktorů, jako je například IDO či prostaglandin E2. Analýza metabolismu ukázala vyšší zapojení glykolýzy u MSCs ovlivněných IFN γ a TNF α ve srovnání s nestimulovanými MSCs (Contreras-Lopez et al., 2020; Liu et al., 2019). Tyto výsledky ukazují, že glykolytický metabolismus je nezbytný pro vykonávání imunomodulační funkce MSCs, a proto by přeprogramování na glykolýzu mohlo být použito ke zvýšení jejich terapeutického potenciálu.



Obrázek 2: Imunomodulační působení MSCs; zkratky: Breg – regulační B-lymfocyty, Treg – regulační T-lymfocyty; vlastní tvorba (vytvořeno v: BioRender.com)

2.2 Terapeutické využití mezenchymálních kmenových buněk

Imunomodulační a regenerační účinky předurčují MSCs k použití v terapiích (shrnuje Fan et al. 2020). Počátkem tohoto roku bylo evidováno 1441 klinických studií, převážně fáze I a fáze II, testujících využití MSCs v léčbě řady onemocnění, jež zahrnují například některé kardiovaskulární, neurodegenerativní a autoimunitní choroby (infarkt myokardu, Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza, diabetes 1. typu), komplikace doprovázející transplantace hematopoetických kmenových buněk nebo orgánů (reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GVHD), rejekce transplantátu) a různé typy poranění (poranění míchy, zlomeniny, popáleniny). První klinická studie, která testovala využití MSCs v léčbě osteogenesis imperfekta, genetického onemocnění kostí, byla zahájena roku 1995 (zdroj: [Mesenchymal Stem Cells | Card Results | ClinicalTrials.gov](#)). Za téměř 30 let testování bezpečnosti a účinnosti terapií založených na MSCs byla v Evropě povolena pouze jedna léčba – Alofisel. Tato terapie, založená na aplikaci MSCs izolovaných z tukové tkáně, je používána k léčbě fistulí u pacientů s Crohnovou chorobou (zdroj: [Alofisel | European Medicines Agency \(europa.eu\)](#)).

2.2.1 Faktory ovlivňující účinnost terapií

Terapie využívající MSCs jsou považovány za bezpečné, avšak jejich účinnost bývá často nedostatečná. To je dáno jednak vysokou heterogenitou MSCs, a jednak nízkou mírou přežívání MSCs po transplantaci. MSCs pocházející z různých zdrojů se liší svými vlastnostmi, a to je potřeba zohlednit při výběru MSCs pro konkrétní terapii. Jak již bylo zmíněno, MSCs izolované

z různých tkání mohou mít odlišný diferenciační potenciál a různou míru exprese povrchových znaků (Mohamed-Ahmed et al., 2018). Rozdíly nejsou dány pouze typem tkáně, z níž byly MSCs získány, ale také dárcem. Řada faktorů, jako je věk, zdravotní stav či pohlaví, má vliv na vlastnosti MSCs. Studie porovávající MSCs izolované z mladých a starých jedinců udávají, že s rostoucím věkem se mění morfologie buněk, snižuje se proliferace a schopnost diferencovat na osteoblasty a chondrocyty (Choudhery et al., 2014; Kornicka et al., 2015). Pohlaví má vliv na imunomodulační působení MSCs (Mckinnirey et al., 2021). Použití MSCs z různých zdrojů pak vede k nekonzistentním výsledkům klinických studií. Experimenty na myších modelech ukazují, že velké procento MSCs umírá již během prvního týdne po transplantaci. Transplantované buňky se dostávají do zánětlivého ischemického prostředí poškozené tkáně, kde zažívají velký metabolický stres, který většina buněk není schopna zvládnout (Moya et al., 2018). Desítky až stovky milionů MSCs jsou potřeba pro jednoho pacienta, aby bylo dosaženo alespoň nějakého účinku. Jelikož nelze dostatečný počet buněk získat od dárce, je nutné je expandovat *in vitro* (Dreyer et al., 2020; Kurtzberg et al., 2020). Standardně jsou MSCs kultivovány za normoxických podmínek při 37 °C. Dlouhodobá kultivace za takovýchto podmínek má však negativní vliv na MSCs. MSCs z pozdních pasáží vykazují se senescencí asociované morfologické změny, snížený proliferační a diferenciační potenciál a omezenou imunomodulační funkci (de Witte et al., 2017; Li et al., 2019; Wang et al., 2021; Yang et al., 2018).

Změna kultivačních podmínek nebo stimulace MSCs různými rozpustnými faktory jsou dva hlavní přístupy, které by mohly pomoci překonat výše zmíněné problémy, a zvýšit tak účinnost terapií. Kultivace MSCs v hypoxii nebo v bezsérovém médiu indukuje metabolické změny, především tedy přechod na glykolýzu a s tím spojené snížení mitochondriální funkce. Takto kultivované MSCs vykazují vyšší přežívání v ischemickém prostředí ve srovnání s MSCs kultivovanými za standardních podmínek (Beegle et al., 2015; Moya et al., 2017). Působení některých cytokinů, růstových faktorů a malých molekul pozitivně ovlivňuje funkce MSCs. Stimulace peroxidem vodíku podporuje jejich přežívání a regenerační účinky (Guo et al., 2020). Přežívání a regenerační účinky jsou zvýšeny také po stimulaci rapamycinem, který v MSCs aktivuje autofagii (Li et al., 2020). Prozánětlivé cytokiny (IFN γ , TNF α), či ligandy toll-like receptoru (TLR)3 a TLR4 jsou naopak používány k aktivaci imunosupresivního působení MSCs (Contreras-Lopez et al., 2020; Liu et al., 2019; Rashedi et al., 2017). Zvýšení přežívání MSCs či podpora jejich imunomodulační a reparační funkce by mohly vést ke snížení

terapeutické dávky MSCs, a tedy ke zkrácení doby kultivace, což by omezilo změny fenotypu, k nimž během *in vitro* expanze dochází.

2.3 Mitochondrie mezenchymálních kmenových buněk

Mitochondrie jsou buněčné organely hrající zásadní roli v energetickém metabolismu. Jsou v buňce největším producentem adenosintrifosfátu (adenosine triphosphate – ATP). Ten je v mitochondriích syntetizován během oxidativní fosforylace a slouží jako zdroj energie v mnoha buněčných procesech. Kromě toho se mitochondrie podílejí na regulaci stavu a funkcí MSCs. Změna struktury a počtu mitochondrií, metabolismu, membránového potenciálu či produkce reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS), všechny tyto faktory mají vliv na sebeobnovu, diferenciaci a apoptózu MSCs a jejich regenerační a imunomodulační působení.

2.3.1 Mitochondriální dynamika

Mitochondrie jsou velmi dynamické organely. V závislosti na stavu a potřebách buňky dochází k jejich fúzi nebo oddělení. Hlavními mediátory fúze mitochondrií jsou transmembránové GTPázy mitofusin 1 (Mfn1), mitofusin 2 (Mfn2) a protein optické atrofie 1 (optic atrophy 1 – Opa1). Mfn1 a Mfn2 se podílejí na fúzi vnější mitochondriální membrány, zatímco Opa1 reguluje fúzi membrány vnitřní a podílí se na remodelaci krist (Song et al., 2009). Pro dělení mitochondrií je zásadní GTPáza nazývaná protein příbuzný dynaminu 1 (dynamine-related protein 1 – Drp1). Drp1 vytváří kolem vnější mitochondriální membrány oligomer prstencovitého tvaru, to vede k zaškrcení a následnému oddělení mitochondrií (Basu et al., 2017).

MSCs v nediferencovaném stavu využívají glykolýzu jako hlavní metabolickou dráhu pro syntézu ATP. Oxidativní fosforylace je u nich snížena. Mitochondrie nediferencovaných MSCs jsou spíše oddělené, tvoří dlouhé mitochondriální sítě (Forni et al., 2016). Feng a kolegové popisují snížení exprese povrchové molekuly CD90 v MSCs po inhibici Drp1, z čehož vyplývá, že dělení mitochondrií se podílí na udržení kmenovosti MSCs (Feng et al., 2019). Během osteogenní a adipogenní diferenciaci dochází k většímu zapojení oxidativního metabolismu, a tedy k nárůstu mitochondriální aktivity. MSCs diferencující na osteoblasty a adipocyty vykazují výrazné propojení mitochondrií. Byla u nich pozorována také zvýšená exprese genů kódujících GTPázy Mfn1 a Mfn2. Chondrogenní diferenciaci je naopak spojena s nárůstem exprese Drp1, který je nezbytný pro dělení mitochondrií. MSCs diferencující na

chondrocyty mají mitochondrie sférického tvaru a preferují, stejně jako nediferencované MSCs, glykolytický metabolismus (Forni et al., 2016; Shum et al., 2016). Ke změnám struktury mitochondrií dochází také při kultivaci MSCs za normoxických podmínek. Během kultivace MSCs se zvyšuje exprese Mfn2 a klesá exprese Drp1, což má za následek fúzi mitochondrií. Tvorba mitochondriální sítě je spojena s přechodem MSCs na oxidativní metabolismus (Li et al., 2019). Apoptóza MSCs je spojena se snížením exprese proteinů asociovaných s mitochondriální fúzí. Mitochondrie apoptotických buněk jsou oddělené a mají narušenou strukturu krist (Ma et al., 2020).

2.3.2 Mitofagie a biogeneze mitochondrií

Mitofagie a mitochondriální biogeneze jsou dva hlavní procesy, které se podílejí na regulaci množství mitochondrií v buňce. Během mitofagie jsou v buňce degradovány nefunkční nebo nadbytečné mitochondrie. Tento proces je regulován PTEN-indukovanou protein kinázou 1 (PTEN-induced kinase 1 – PINK1) a E3 ubikvitin ligázou Parkin. PINK1 se akumuluje na vnější membráně depolarizovaných mitochondrií, kde zároveň dochází k její autofosforylaci. To aktivuje ligázu Parkin, která ubikvitinuje proteiny vnější mitochondriální membrány, jako jsou například Mfn1 a Mfn2. Mitochondrie značené ubikvitinem jsou následně degradovány autofagií (Vives-Bauza et al., 2010). Syntéza nových mitochondrií je vyžadována při buněčném dělení nebo při zvýšení energetických potřeb buňky. Proces mitochondriální biogeneze zahrnuje replikaci mitochondriální DNA (mitochondrial DNA – mtDNA) a transkripci a translaci mitochondriálních proteinů, které jsou kódovány jednak v jádře, a jednak v mitochondrii. Jeho hlavním regulátorem je PPAR γ koaktivátor 1 alfa (PPAR γ coactivator 1 alpha – PGC-1 α) (Wu et al., 1999).

Hromadění poškozených mitochondrií v buňce vede k indukci senescence či apoptózy. Mitofagie, během níž jsou poškozené mitochondrie odstraňovány, potlačuje senescenci MSCs (Lee et al., 2020) a podílí se také na udržování jejich kmenovosti (Feng et al., 2021). Fan a kolegové ukázali, že krátkodobý oxidační stres aktivuje mitofagii jako protektivní účinek proti oxidačnímu poškození. Vystavení MSCs dlouhodobému oxidačnímu stresu však vede ke snížení mitofagie a indukci apoptózy (Fan et al., 2019). Osteogenní a adipogenní diferenciace MSCs je doprovázena nárůstem mitochondriální masy. Zvyšuje se exprese PGC-1 α a přibývá kopií mtDNA, což potvrzuje probíhající biogenezi mitochondrií (Forni et al., 2016; Zhang et al., 2013). Během diferenciace MSCs na chondrocyty dochází ke snížení mitochondriální aktivity, jež je zprostředkováno fragmentací mitochondrií a mitofagií (Forni et al., 2016).

Mitofagie hraje důležitou roli také při osteogenní diferenciaci, kde se podílí na udržování buněčné homeostázy odstraněním poškozených mitochondrií. Zhang a kolegové ve své studii uvádějí, že exprese Parkin během osteogenní diferenciacie narůstá. MSCs, u kterých je exprese Parkin potlačena, mají sníženou schopnost diferencovat na osteoblasty (Zhang et al., 2020).

2.3.3 Reaktivní formy kyslíku

Mitochondrie jsou největším producentem ROS v buňce. ROS zde vznikají jako vedlejší produkt oxidativní fosforylace, a to především činností komplexu I, komplexu II a komplexu III mitochondriálního dýchacího řetězce (Quinlan et al., 2013). ROS mají v buňce důležitou roli, jelikož fungují jako signální molekuly. Avšak jejich nadměrná produkce je příčinou oxidačního stresu, jenž přispívá k buněčné senescenci (Jeong & Cho, 2015; Lin et al., 2018).

Nediferencované MSCs sídlící v hypoxických nikách preferují glykolytický metabolismus, čímž omezují produkci mitochondriálních ROS. Z toho důvodu nedochází k oxidativnímu poškození buněk a MSCs vykazují delší životnost (Estrada et al., 2012). Přidání antioxidantů však zabraňuje vstupu MSCs do S fáze buněčného cyklu. Určité hladiny ROS jsou proto nezbytné pro udržení schopnosti sebeobnovy MSCs (Lyublinskaya et al., 2015). Během kultivace za normoxických podmínek dochází ke zvýšení mitochondriální aktivity. Zvyšuje se také produkce ROS, což má za následek nárůst počtu senescentních MSCs. Souvislost mezi produkcí ROS a senescencí byla prokázána přidáním antioxidantů, které vedlo ke snížení počtu senescentních MSCs v kultuře (Jeong & Cho, 2015; Yang et al., 2018). ROS se podílejí také na regulaci diferenciacie MSCs. Mitochondriální ROS jsou nezbytné pro adipogenní diferenciaci (Wang et al., 2015). Naopak osteogenní diferenciacie je při zvýšené produkci ROS potlačena. Toto zjištění vysvětluje zvýšený výskyt osteoporózy u starších jedinců, jelikož s věkem narůstá v buňce množství ROS, které negativně ovlivňují schopnost MSCs diferencovat na osteoblasty (Lin et al., 2018). Chen a kolegové ve své studii popisují zvýšení exprese antioxidantních enzymů, konkrétně superoxid dismutázy a katalázy, v průběhu osteogenní diferenciacie MSCs. Antioxidanti enzymy v buňce zabraňují hromadění intracelulárních ROS, a to i přes větší zapojení oxidativního metabolismu u osteogenně diferencujících MSCs (Chen et al., 2008). Zvýšená exprese antioxidantních enzymů byla pozorována také při adipogenní diferenciaci MSCs, pro kterou je sice určité množství ROS vyžadováno, ale stále musí být regulováno prostřednictvím antioxidantních enzymů, aby se zabránilo oxidativnímu poškození buňky (Higuchi et al., 2013). V rozporu s tím jsou výsledky Wang a kolegů, které nepopisují rozdíl v expresi antioxidantních enzymů mezi nediferencovanými a adipogenně diferencujícími MSCs

(Wang et al., 2015). Časná fáze diferenciacie MSCs na chondrocyty je doprovázena snížením exprese antioxidantních enzymů a s tím spojeným nárůstem intracelulárních ROS, které se pravděpodobně na regulaci chondrogenní diferenciacie podílejí (Tangtrongsup & Kisiday, 2018).

2.4 Přenos mitochondrií z mezenchymálních kmenových buněk

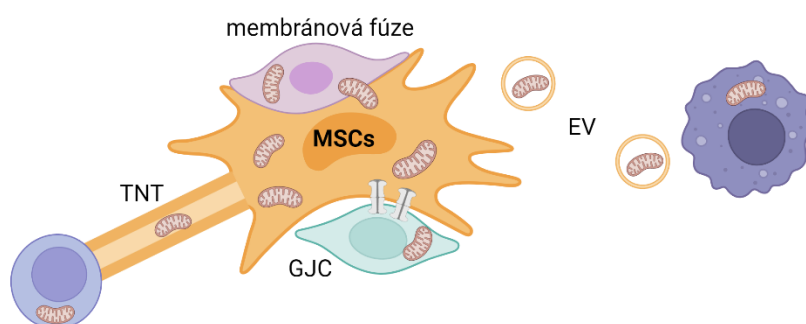
Přenos mitochondrií je jeden z mechanismů, které MSCs využívají k regeneraci poškozené tkáně a imunomodulaci. Poprvé byl popsán roku 2006, kdy bylo zjištěno, že při kokultivaci MSCs s buňkami A549, které měly poškozené mitochondrie, dochází k přenosu funkčních mitochondrií z MSCs do buněk A549, což vede k obnovení mitochondriální funkce a záchraně těchto buněk (Spees et al., 2006). Islam a kolegové ve své studii, která se zabývá transplantací MSCs myším s akutním poškozením plic, přinesli důkaz o protektivním účinku přenosu mitochondrií z MSCs *in vivo*. Mitochondriální přenos z MSCs, ne však z MSCs s defektními mitochondriemi, vedl k obnově energetického metabolismu alveolárních epiteliálních buněk a celkově vyššímu přežití myši s akutním poškozením plic (Islam et al., 2012). V posledních několika letech je mitochondriální přenos z důvodu jeho potenciálu pro využití v terapiích intenzivně studován.

MSCs mohou předávat mitochondrie různým typům buněk, příkladem jsou epiteliální buňky, myocyty nebo imunitní buňky (Court et al., 2020; Konari et al., 2019; Mori et al., 2023). Přenos mitochondrií z MSCs byl popsán také u některých typů rakovin, kde byl prokázán jeho pozitivní efekt na růst nádoru. Jako příklad lze uvést skupinu nádorových onemocnění označovanou jako akutní leukémie. Leukemické buňky a MSCs sdílejí společnou niku v kostní dřeni. Buněčný stres vyvolaný určitými chemoterapeutiky indukuje přenos mitochondrií z MSCs do leukemických buněk, což má za následek zvýšení Krebsova cyklu a oxidativní fosforylace v buňkách nádoru a podporu jejich antioxidantní ochrany. Ve výsledku působení MSCs podporuje přežívání a chemorezistenci leukemických buněk (Burt et al., 2019; Forte et al., 2020). Mitochondriální přenos je studován především u patologických stavů. Jak již bylo zmíněno, mitochondrie přenesené z MSCs mají protektivní účinek – podporují energetický metabolismus, snižují oxidační stres a inhibují apoptózu recipientních buněk. Stimulace MSCs k přenosu mitochondrií je zprostředkována stresovými signály, které jsou uvolňovány buňkami v místě poškození. Jedním ze signálů jsou samotné mitochondrie. Mahrouf-Yorgov a kolegové zjistili, že MSCs pohlcují a následně degradují mitochondrie uvolněné z poškozených buněk. To indukuje expresi enzymu hem oxygenázy 1, jenž aktivuje mitochondriální biogenezi

v MSCs. Zvýšení mitochondriální masy pak umožňuje MSCs darovat funkční mitochondrie poškozeným buňkám a zároveň si udržet vlastní energetickou homeostázu (Mahrouf-Yorgov et al., 2017). Nárůst ROS související s oxidačním stresem buněk je považován za další signál, který indukuje mitochondriální přenos z MSCs (Burt et al., 2019). Je důležité poznamenat, že k přenosu mitochondrií nedochází pouze při poškození buněk, ale také za fyziologických podmínek. Přenos mitochondrií z MSCs za fyziologických podmínek není dostatečně studován, pravděpodobně však hraje roli při vývoji a podílí se na udržování tkáňové homeostázy (Acquistapace et al., 2011; Sinclair et al., 2016).

2.4.1 Mechanismy mitochondriálního přenosu

Mitochondrie mohou být mezi buňkami předávány prostřednictvím tunelových nanotrubiček (tunneling nanotubes – TNT), EV, volných spojů (gap junctions – GJC) nebo membránové fúze (Acquistapace et al., 2011; Sinclair et al., 2016) (obrázek 3). Vybrané mechanismy mitochondriálního přenosu jsou více popsány níže.



Obrázek 3: Mechanismy mitochondriálního přenosu; zkratky: TNT – tunelové nanotrubičky, GJC – volné spoje, EV – extracelulární váčky; vlastní tvorba (vytvoreno v: BioRender.com)

Co se terapeutického využití mitochondriálního přenosu týče, kromě již zmíněné transplantace MSCs nebo z nich izolovaných EV probíhá v současné době preklinické a klinické testování použití izolovaných mitochondrií v léčbě různých onemocnění, především chorob spojených s mitochondriálními defekty, kardiovaskulárních a zánětlivých onemocnění. Výsledky studií na zvířecích modelech ukazují, že injikované mitochondrie izolované z MSCs jsou buňkami internalizovány, podporují jejich přežívání a funkci, snižují oxidační stres a potlačují zánět (De Carvalho et al., 2021; Liang et al., 2023; Pourmohammadi-Bejarpasi et al., 2020; Yu et al., 2022).

2.4.1.1 Tunelové nanotrubičky

TNT jsou aktinová filamenta nebo mikrotubuly obsahující cytoplazmatické výběžky o délce až 100 μm . Jejich šířka dosahuje desítek až stovek nm, přičemž TNT obsahující pouze aktinová filamenta bývají užší než TNT obsahující také mikrotubuly (Sanchez et al., 2017). Jedná se o dynamické struktury, které zprostředkovávají přímé propojení buněk, jež umožňuje obousměrný přenos buněčného obsahu. Buňky si skrze TNT mohou předávat váčky endoplazmatického retikula, váčky Golgiho aparátu, lysozomy, mitochondrie a různé biomolekuly, mezi něž patří například proteiny či mikroRNA (Lu et al., 2019; Sanchez et al., 2017; Schiller et al., 2013). TNT mohou sloužit také jako prostředek k přenosu patogenních agens. Studie ukazují, že některé viry indukují tvorbu TNT a následně je využívají k šíření do okolních buněk (Kumar et al., 2017; Panasiuk et al., 2018).

Buňky vystavené stresovým podmínkám vykazují vyšší tvorbu TNT ve srovnání s buňkami kultivovanými za standardních podmínek. Stresové a apoptotické signály, jako je nárůst intracelulárních ROS či vystavení fosfatidylserinu na buněčném povrchu, se podílejí na indukci tvorby TNT, a podporují tak regenerační působení MSCs (Liu et al., 2014; Yang et al., 2020). Tvorba TNT se zvyšuje také v prostředí zánětu. Zhang a kolegové ukázali, že v odpovědi na prozánětlivý cytokin $\text{TNF}\alpha$ dochází v MSCs ke zvýšení exprese $\text{TNF}\alpha$ indukovaného proteinu 2, který podporuje polymeraci aktinu, a tedy i tvorbu TNT (Zhang et al., 2016). Použití inhibitorů polymerace aktinu, jež blokuje tvorbu TNT, má za následek potlačení mitochondriálního přenosu a reparace poškozených buněk zprostředkované MSCs (Liu et al., 2014; Yang et al., 2020).

2.4.1.2 Extracelulární váčky

EV jsou lipidovou membránou ohraničené útvary uvolňované buňkou do mezibuněčného prostoru. Jejich průměr se pohybuje v rozmezí 50 a 1000 nm. Podle velikosti a způsobu vzniku se rozdělují na tři základní typy – nejmenší exozomy, dále mikrovezikuly a apoptotická tělíska. Jak již bylo zmíněno v kapitole o imunomodulační funkci MSCs, EV mohou obsahovat různé rozpustné i povrchové molekuly či mikroRNA (Kim et al., 2020; Li et al., 2021). Výjimečný není ani přenos celých organel. Lu a kolegové udávají, že až 40 % EV izolovaných z MSCs obsahuje mitochondrie. Tyto mitochondrie jsou funkční, po vstupu do recipientní buňky se začlení do její mitochondriální sítě a podílejí se na obnově mitochondriální funkce (Lu et al., 2022). Protektivní efekt má také přenos mitochondriálních komponent. Endocytóza z MSCs izolovaných exozomů, které obsahují mtDNA a mitochondriální proteiny, vede ke zvýšení

mitochondriálního membránového potenciálu, nárůstu oxidativní fosforylace a snížení ROS v recipientních buňkách (Xia et al., 2022).

2.4.2 Přenos mitochondrií do imunitních buněk

Přenos mitochondrií je jeden z mechanismů využívaný MSCs k imunomodulaci. Stav imunitních buněk úzce souvisí s jejich energetickým metabolismem. Je známo, že při aktivaci přecházejí prozánětlivé imunitní buňky na glykolýzu. I přes to, že energetická účinnost glykolýzy je v porovnání s oxidativní fosforylací nižší, je glykolýza využívána dělicími se buňkami jako rychlý zdroj ATP. Uhlíkaté látky a redukované koenzymy, které během glykolýzy vznikají, jsou potřebné pro syntézu makromolekul vyžadovaných během proliferace a diferenciaci imunitních buněk (Freemerman et al., 2014; Menk et al., 2018). Oproti tomu protizánětlivý fenotyp imunitních buněk je spojován s oxidativní fosforylací (Howie et al., 2017; Wang et al., 2018). Přenos mitochondrií z MSCs do imunitních buněk indukuje metabolické změny v recipientních buňkách. Dochází ke zvýšení mitochondriální respirace, a tedy k potlačení prozánětlivého působení imunitních buněk (Jackson et al., 2016; Luz-Crawford et al., 2019).

2.4.2.1 Makrofágy

Makrofágy jsou buňky přirozené imunity, jejichž hlavní funkcí je fagocytóza. Pohlcením a likvidací patogenů se podílejí na boji s infekcí. Fagocytóza apoptotických buněk je naopak nezbytná pro udržení tkáňové homeostázy. Makrofágy se dělí na dva hlavní subtypy – klasicky aktivované M1 makrofágy s prozánětlivým účinkem a alternativně aktivované M2 makrofágy, jež se uplatňují především v protizánětlivé odpovědi imunitního systému (Mills et al., 2000).

Přenos mitochondrií z MSCs do makrofágů byl prokázán jednak během kokultivace těchto buněk *in vitro*, a jednak v myším modelu *in vivo*. Makrofágy, jež získaly mitochondrie od MSCs, vykazují zvýšenou spotřebu kyslíku a nárůst membránového potenciálu mitochondrií, což poukazuje na vyšší zapojení oxidativní fosforylace. Přenos mitochondrií indukuje v makrofázích expresi PGC-1 α , který se podílí na podpoře mitochondriální funkce tím, že aktivuje biogenezi mitochondrií (Yuan et al., 2021). Přeprogramování energetického metabolismu je spojeno se změnou polarizace makrofágů. Mitochondriální přenos podporuje polarizaci makrofágů směrem k M2 fenotypu. Polarizace makrofágů do prozánětlivého M1 fenotypu je naopak potlačena (Morrison et al., 2017; Xia et al., 2022; Yuan et al., 2021). Xia a kolegové ve své studii popisují, že po podání EV izolovaných z MSCs myším s akutním poškozením plic dochází k přenosu mitochondrií do alveolárních makrofágů. Produkce

prozánětlivých cytokinů asociovaných s M1 fenotypem, jako jsou TNF α a IL-1 β , je po podání EV snížena, zatímco produkce IL-10 se zvyšuje. Celkově má podání EV a jimi zprostředkovaný mitochondriální přenos pozitivní vliv na plicní funkci a přežívání myši s akutním poškozením plic (Xia et al., 2022). S mitochondriálním přenosem je též spojován antimikrobiální účinek MSCs. Makrofágy, jež přijaly mitochondrie od MSCs, vykazují vyšší fagocytickou aktivitu ve srovnání s makrofágy, které mitochondrie nedostaly, a mají tudíž zvýšenou schopnost likvidovat extracelulární bakterie (Jackson et al., 2016; Morrison et al., 2017). Z mechanismů se při přenosu mitochondrií mezi MSCs a makrofágy uplatňují především TNT a EV (Jackson et al., 2016; Xia et al., 2022). Braza a kolegové, kteří testovali účinky terapie MSCs na myším modelu astmatu, ve své studii ukazují, že injikované MSCs jsou makrofágy fagocytovány, a tím indukují jejich změnu na M2 fenotyp, potlačují zánět dýchacích cest a zmírňují projevy astmatu (Braza et al., 2016). Fagocytóza je proto považována za další možný mechanismus uplatňující se v přenosu mitochondrií z MSCs do makrofágů.

2.4.2.2 Lymfocyty

Buněčná složka adaptivní imunity je tvořena T-lymfocyty a B-lymfocyty. Výsledky studie Luz-Crawfordové a kolegů ukazují, že oba typy lymfocytů mohou přijímat mitochondrie od MSCs během kokultivace *in vitro*, přičemž nejvyšší mitochondriální přenos probíhá do CD4⁺ T-lymfocytů, následují B-lymfocyty a CD8⁺ T-lymfocyty (Luz-Crawford et al., 2019). K mitochondriálnímu přenosu dochází také mezi MSCs a buňkami akutní lymfoblastické leukémie odvozenými jak z B-lymfocytů, tak z T-lymfocytů. V obou případech je přenos mitochondrií zprostředkován především TNT a podporuje rezistenci nádorových buněk vůči chemoterapeutikům indukujícím oxidační stres (Burt et al., 2019; Wang et al., 2018). Porovnání B-lymfocytů a buněk B-buněčné akutní lymfoblastické leukémie ukazuje, že mitochondriální přenos z MSCs do nádorových buněk je několikanásobně vyšší (Burt et al., 2019). O přenosu mitochondrií z MSCs do B-lymfocytů toho není příliš známo, proto bude dále věnována pozornost T-lymfocytům.

Přenos mitochondrií z MSCs do CD4⁺ T-lymfocytů je spojován s utlumením prozánětlivé odpovědi. Diferenciace CD4⁺ T-lymfocytů na Th17 buňky je doprovázena změnou metabolismu na glykolýzu. Th17 buňky, jež dostaly mitochondrie od MSCs, vykazují zvýšenou spotřebu kyslíku, což vypovídá o větším využití oxidativní fosforylace, která je u imunitních buněk spojována s protizánětlivým fenotypem. Zároveň tyto buňky vykazují sníženou produkci IL-17 a zvýšenou expresi Foxp3, což potvrzuje jejich změnu ve směru protizánětlivém

(Luz-Crawford et al., 2019). Přenos mitochondrií z MSCs se podílí také na potlačení Th1 odpovědi. Inkubace aktivovaných CD4⁺ T-lymfocytů s mitochondriemi izolovanými z MSCs vede ke snížení exprese Tbet a poklesu produkce IFN γ u buněk, jež přijaly mitochondrie (Akhter et al., 2023). Obecně T-lymfocyty, které dostaly mitochondrie od MSCs, méně proliferují a jejich aktivace je potlačena (Agrawal et al., 2021; Akhter et al., 2023). O imunosupresivním působení vypovídá také nárůst počtu Treg indukovaný přijetím mitochondrií od MSCs. T-lymfocyty, jež přijaly mitochondrie od MSCs, vykazují zvýšenou a stabilnější expresi Foxp3, transkripčního faktoru zásadního pro regulaci genové exprese Treg (Agrawal et al., 2021; Do et al., 2021; Luz-Crawford et al., 2019). Do a kolegové ve své studii ukazují, že podání Treg indukovaných v kokultivaci s MSCs myším s GVHD potlačuje prozánětlivou odpověď zprostředkovanou CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty více než podání Treg indukovaných v nepřítomnosti MSCs. Inhibice mitochondriálního přenosu vede ke snížení počtu Foxp3⁺ T-lymfocytů v kokultivaci s MSCs a k redukci jejich imunosupresivního působení jak *in vitro*, tak *in vivo*. Z těchto výsledků vyplývá, že přenos mitochondrií z MSCs je zásadní pro indukci diference Treg a pro podporu jejich funkce (Do et al., 2021).

3 Cíle práce

MSCs mají schopnost modulovat imunitní odpověď. Studie z posledních několika let ukazují, že důležitou roli při imunosupresi zprostředkované MSCs hraje mitochondriální přenos, který vyvolává metabolické změny v recipientních buňkách, a tím se podílí na regulaci jejich stavu. Díky svým vlastnostem jsou MSCs slibnými kandidáty pro využití v terapiích. Preklinické a klinické testování ale nedosáhlo požadovaných výsledků. Nízká účinnost terapií založených na MSCs je způsobena především nízkým přežíváním transplantovaných buněk. S tím je spojena potřeba dlouhodobé kultivace, aby bylo dosaženo dostatečného počtu buněk pro terapii. Avšak dlouhodobá kultivace za standardních podmínek negativně ovlivňuje MSCs, včetně jejich imunosupresivní funkce. Předpokládáme, že stimulace MSCs určitými faktory by mohla podpořit jejich funkci, a zvýšit tak účinnost terapií.

Tato práce se zaměřuje na modulaci mitochondriálního přenosu z MSCs do imunitních buněk. Cílem je:

- určit vliv rapamycinu, IGF-1, IFN γ a oligomycinu na MSCs a jejich schopnost předávat mitochondrie imunitním buňkám
- popsat změny fenotypu imunitních buněk indukované působením různě stimulovaných MSCs

Ovlivnění byla vybrána na základě těchto poznatků:

- **Rapamycin**, inhibitor kinázy mTOR, aktivuje autofagii, a tím podporuje přežívání a regenerační účinky MSCs (Li et al., 2020).
- Růstový faktor **IGF-1** podporuje biogenezi mitochondrií (Lyons et al., 2017).
- **IFN γ** je běžně používán k aktivaci imunomodulačního působení MSCs (Javorkova et al., 2014). Podporuje také přechod MSCs na glykolýzu (Liu et al., 2019).
- **Oligomycin** inhibuje ATP syntázu, a blokuje tak oxidativní fosforylaci v MSCs (Contreras-Lopez et al., 2020).

Všechny vybrané faktory mají vliv na mitochondrie nebo metabolismus MSCs. Předpokládáme proto, že jejich působením bude ovlivněna také schopnost MSCs přenášet mitochondrie do imunitních buněk. U imunitních buněk, které dostanou mitochondrie, očekáváme přechod na protizánětlivý fenotyp.

4 Materiály a metody

4.1 Zvířata

V tomto projektu byly použity 7-12 týdnů staré myši inbredního kmene BALB/c, které byly pořízeny od společnosti AnLab, s.r.o. (Praha, Česká republika).

4.2 Média

MSCs byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium; Biosera, Cholet, Francie; katalogové č.: LM-D1111/500), do něhož bylo přidáno 10% fetální bovinní sérum (fetal bovine serum – FBS; Biosera; katalogové č.: FB-1090/500), 10mM HEPES pufr (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Carl Roth, Karlsruhe, Německo; katalogové č.: R.6763.2) a antibiotika – penicilin (100 U/ml; Merck and Co., St. Louis, Missouri, USA; katalogové č.: P8721) a streptomycin (100 mg/ml; Merck; katalogové č.: S6501).

Na kultivaci MSCs v přítomnosti ovlivnění a stejně tak na izolaci splenocytů a následnou kokultivaci bylo použito RPMI médium (Roswell Memorial Park Institute 1640 medium; Merck; katalogové č.: R8758) doplněné o 10% FBS, HEPES pufr (10 mM) 2-merkaptóetanol (0,05 mM; Merck; katalogové č.: M3148) a antibiotika – penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 mg/ml).

Pro měření metabolické aktivity MSCs s využitím Seahorse XF HS Mini analyzáru bylo použito Seahorse XF DMEM médium (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornie, USA; katalogové č.: 103575-100), které bylo doplněno o glukózu (10 mM; Agilent Technologies; katalogové č.: 103577-100), pyruvát (1 mM; Agilent Technologies; katalogové č.: 103578-100) a L-glutamin (2 mM; Agilent Technologies; katalogové č.: 103579-100).

4.3 Roztoky

- Fosfátový pufr (phosphate saline buffer – PBS) – pH 7,2-7,4
 - 10 mM fosfát
 - 37 mM NaCl
 - 2,7 mM KCl

Stanovení koncentrace celkových proteinů bicinchoninovou metodou (BCA metoda):

- Reagent B
 - 4 g kyseliny bicinchoninové
 - 100 ml dH₂O
- Reagent C
 - 0,4 g síranu měďnatého (5x hydratovaný)
 - 10 ml dH₂O
- Reagent A – pH 11,25
 - 6,84 g uhličitanu sodného (bezvodý)
 - 1,6 g vinanu sodného
 - 100 ml dH₂O

4.4 Technické vybavení

- Laminární box CleanAir (Schoeller Instruments s.r.o., Praha, Česká republika)
- Laminární box SafeFAST premium (DASIT group, Cornaredo, Itálie)
- CO₂ inkubátor (Sanyo, Osaka, Japonsko)
- Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, UK)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- Průtokový cytometr LSR II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Fluorescenční a optický mikroskop Leica Dmi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo)
- Spektrofotometr microplate reader ELx800 (Biotek, Winooski, Vermont, USA)
- Mikroobjemový UV-Vis Spektrofotometr NanoDrop One/One^c (Thermo Fisher ScientificTM, Waltham, Massachusetts, USA)
- PTC-100 Thermal Cycler (BioRad/MJ Research, Hercules, Kalifornie, USA)
- LigthCycler 480 II (Roche, Rotkreuz, Švýcarsko)
- Agilent Seahorse XF HS Mini analyzér (Agilent Technologies)

4.5 Software

- Software pro ovládání průtokového cytometru LSR II – FACSDiva Software (Becton, Dickinson and Company)

- Software pro analýzu dat z průtokové cytometrie – GateLogic 400.2A (Invai, Mentone, Austrálie)
- Software pro ovládání spektrofotometru microplate reader ELx800 – Revelation Quicklink (Dynex Technologies, Chantilly, Virginie, USA)
- Software pro ovládání LightCycler 480 II a analýzu dat – LightCycler 480 (Roche)
- Software pro analýzu dat získaných z měření na Seahorse XF HS Mini analyzáru – Agilent Seahorse Analytics (Agilent Technologies)
- Software pro statistickou analýzu – GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornie, USA)

4.6 Izolace a kultivace MSCs

V této práci byly použity MSCs izolované z tukové tkáně myší kmene BALB/c. Tuková tkáň byla odebírána z tříselné oblasti. Odebraná tkáň byla promyta PBS a rozstříhána na menší kousky. Následně byla tkáň štěpena 10% roztokem kolagenázy I (Merck; katalogové č.: C2674) při 37 °C po dobu 60 minut, v průběhu byla směs jednou promíchána. Rozštěpená tuková tkáň byla přepipetována do zkumavky, doplněna PBS a centrifugována (8 °C, 170 g, 4 minuty). Peleta byla odebrána do čisté zkumavky, doplněna PBS a znovu centrifugována (8 °C, 170 g, 4 minuty). Tento postup byl ještě dvakrát zopakován, při čtvrtém promytí však bylo místo PBS použito DMEM. Po centrifugaci byla peleta resuspendována v DMEM a přepipetována do kultivační lahve (Thermo scientificTM BioLite; katalogové č.: 130189). Buňky byly kultivovány v inkubátoru s 5% CO₂ při teplotě 37 °C. Po 48 hodinách byly neadherentní buňky odmyty. Adherentní buňky byly dále kultivovány a pasážovány. MSCs 3. až 6. pasáže byly použity na experimenty. Izolace a kultivace MSCs byla prováděna technickou pracovnící naší laboratoře.

4.7 Ovlivnění MSCs

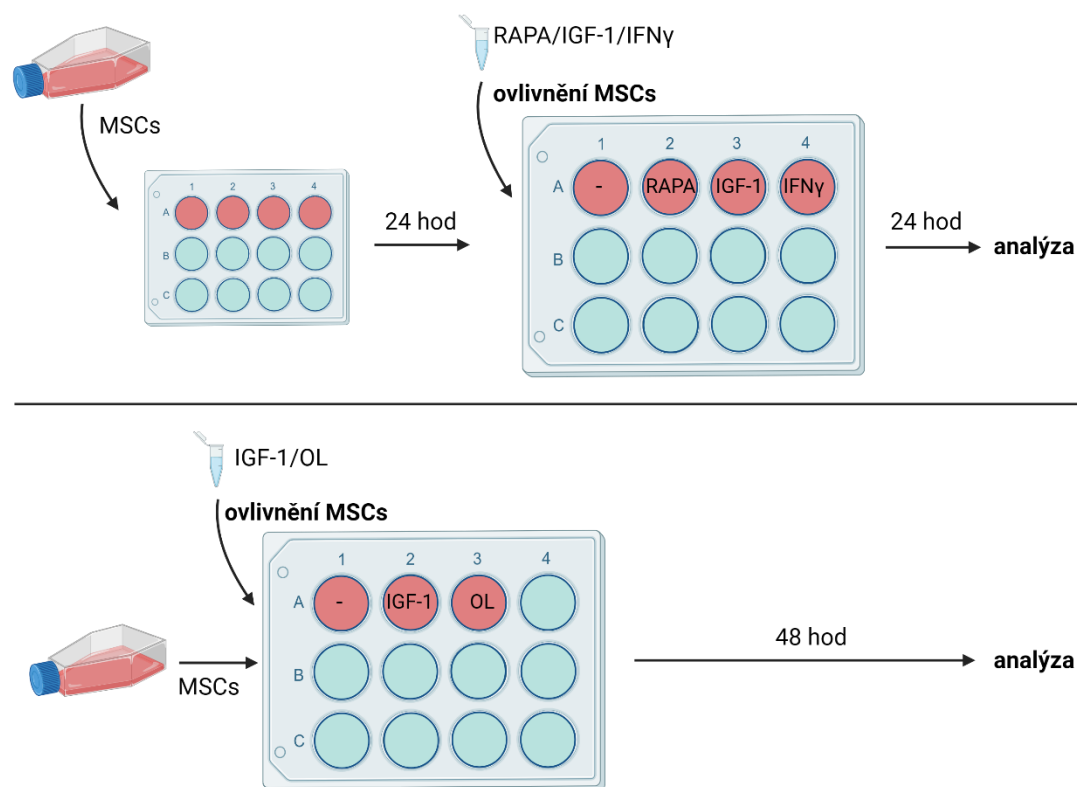
Médium z kultivační lahve bylo odlito a dno lahve bylo opláchnuto PBS. Následně bylo přidáno 500 µl trypsinu, aby se adherentní buňky odlepily. Po 5 minutách bylo do lahve přidáno 6 ml RPMI. MSCs byly seškrábány pomocí škrabky, přeneseny do zkumavky a centrifugovány (8 °C, 170 g, 8 minut). Po centrifugaci byl odlit supernatant a buňky byly resuspendovány v 1 ml RPMI. MSCs byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky, nasazeny podle typu experimentu do kultivační destičky (tabulka 1) a inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂ 24 hodin. Po 24 hodinách byly MSCs stimulovány rapamycinem (0,5 µg/ml; Merck; katalogové č.: 37094), IGF-1 (10 ng/ml; PeproTech, Cranbury, New Jersey, USA; katalogové č.: 250-19), nebo IFN γ (10 ng/ml; PeproTech; katalogové č.: 315-05) a inkubovány spolu s ovlivněním dalších

24 hodin při 37 °C. V druhé části této práce byly MSCs stimulovány buď IGF-1, nebo oligomycinem (15 μM; Merck; katalogové č.: O4867) po dobu 48 hodin. Tato ovlivnění byla přidána k MSCs ihned po nasazení buněk do kultivační destičky (obrázek 4).

Tabulka 1: Nasazení MSCs do kultivační destičky

	kultivační destička	počet buněk
průtoková cytometrie	12-jamková destička ¹	2x10 ⁵ MSCs v 2 ml RPMI
qPCR	12-jamková destička ¹	5x10 ⁵ MSCs v 2 ml RPMI
mikroskopie	24-jamková destička ¹ (+ sklíčko)	2x10 ⁴ MSCs v 1 ml RPMI
WST test	96-jamková destička ¹	1x10 ⁴ MSCs v 200 μl RPMI
Seahorse	8-jamková mikrodestička ²	1,5x10 ⁴ MSCs v 80 μl RPMI

¹Nunc, Roskilde, Dánsko, ²Agilent Technologies



Obrázek 4: Schéma znázorňující stimulaci MSCs; zkratky: - – nestimulované MSCs, RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama, OL – oligomycin; vlastní tvorba (vytvořeno v: BioRender.com)

4.8 Analýza MSCs

4.8.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla použita k detekci povrchových znaků, mitofagie, mitochondriální masy a mitochondriálního membránového potenciálu u různě ovlivněných MSCs. Dále byla s využitím této metody detekována tvorba ROS a NO.

4.8.1.1 Fenotypizace MSCs

Povrchové znaky byly detekovány průtokovou cytometrií u MSCs stimulovaných 24 hodin rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ . Buňky byly připraveny dle následujícího protokolu:

- Odlít médium a 2x promýt PBS
- Přidat do každé jamky 200 μ l trypsinu a inkubovat 7 minut při 37 °C
- Přidat do každé jamky 3 ml RPMI, buňky seškrábat a přenést do zkumavky
- Centrifugovat (8 °C, 170 g, 8 minut)
- Odlít supernatant, přenést zkumavky na led a resuspendovat buňky v 200 μ l PBS
- Přenést buňky do 96-jamkové destičky s kulatým dnem (Nunc) v objemu 200 μ l na jamku
- Centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty) a poté rozvolnit peletu použitím vortexu
- Přidat 10 μ l naředěné monoklonální protilátky proti povrchovému znaku konjugované s fluorochromem (tabulka 2), inkubovat 30 minut ve tmě při 4 °C
- 2x promýt 200 μ l PBS a centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty)
- Do každé jamky přidat 200 μ l PBS, obarvit mrtvé buňky přidáním 20 μ l Hoechst 33258 (1:40 000; Merck; katalogové č.: 94403)
- Měřit na průtokovém cytometru LSR II (gatovací strategie je znázorněna na obrázku 5)

Tabulka 2: Seznam použitých monoklonálních protilátek proti povrchovým znakům

znak	fluorochrom	ředění	klon	výrobce	katalogové č.
CD11b	APC	1:100	M1/70	BioLegend	101212
CD31	PE	1:40	390	BioLegend	102407
CD34	PE	1:100	HM34	BioLegend	128609
CD45	APC	1:150	30-F11	BioLegend	103112
CD29	PE	1:100	HMb1-1	Invitrogen	12-0291-82
CD44	FITC	1:40	IM7	BioLegend	103005
CD73	PE	1:120	TY/11.8	Invitrogen	12-0731-82
CD90.2	APC	1:100	30-H12	SONY	1126560
CD105	AF488	1:40	MJ7/18	BioLegend	120406

4.8.1.2 Měření mitofagie

Mitophagy detection kit (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japonsko; katalogové č.: MD01-10) byl použit k měření mitofagie metodou průtokové cytometrie u MSCs ovlivněných rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ . Tento kit obsahuje detekční činidlo MitophagyDye (tabulka 3) značící mitochondrie v buňkách. MitophagyDye je slabě fluorescenční, avšak po fúzi mitochondrie a lysozomu, ke které dochází po indukci mitofagie, se jeho fluorescence výrazně zvyšuje. Příprava buněk probíhala dle pokynů poskytnutých výrobcem:

- MSCs nasadit na destičku a inkubovat 24 hodin při 37 °C
- Odlít médium a 2x promýt buňky 0% RPMI
- Přidat 300 μ l MitophagyDye (100nM) na jamku a inkubovat 30 minut při 37 °C
- 2x promýt buňky 0% RPMI
- Stimulovat buňky rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ a inkubovat 24 hodin při 37 °C
- Přidat do každé jamky 200 μ l trypsinu a inkubovat 7 minut při 37 °C
- Přidat do každé jamky 3 ml RPMI, buňky seškrábat a přenést do zkumavky

Následně byly buňky připraveny na analýzu na průtokovém cytometru:

- Centrifugovat (8 °C, 170 g, 8 minut)
- Odlít supernatant, přenést zkumavky na led a resuspendovat buňky v 200 μ l PBS
- Přenést buňky do 96-jamkové destičky s kulatým dnem v objemu 200 μ l na jamku a centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty)
- 2x promýt 200 μ l PBS a centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty)
- Do každé jamky přidat 200 μ l PBS, obarvit mrtvé buňky přidáním 20 μ l Hoechst 33258 (1:40 000)
- Měřit na průtokovém cytometru LSR II (gatovací strategie je znázorněna na obrázku 5)

4.8.1.3 Měření mitochondriální masy a membránového potenciálu mitochondrií

Mitochondriální masa a mitochondriální membránový potenciál MSCs ovlivněných rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ byly detekovány průtokovou cytometrií. K fluorescenčnímu značení mitochondrií byl použit buďto MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific – InvitrogenTM; katalogové č.: M7512) (tabulka 3), kationické barvivo akumulující se v mitochondriích s membránovým potenciálem, nebo MitoSpy Green FM (BioLegend, San Diego, Kalifornie, USA; katalogové č.: 424805) (tabulka 3), který značí mitochondrie nezávisle

na membránovém potenciálu, a používá se proto k detekci mitochondriální masy. Příprava buněk probíhala dle následujícího protokolu:

- Odlít médium a 2x promýt PBS
- Přidat do každé jamky 200 μ l trypsinu a inkubovat 7 minut při 37 °C
- Přidat do každé jamky 3 ml RPMI, buňky seškrábat a přenést do zkumavky
- Centrifugovat (8 °C, 170 g, 8 minut)
- Barvit buňky v 1 ml MitoTracker Red CMXRos (100 nM), nebo v 1 ml MitoSpy Green (250 nM) 30 minut při 37 °C
- Připravit buňky na měření na průtokovém cytometru (viz protokol výše)
- Měřit na průtokovém cytometru LSR II (gatovací strategie je znázorněna na obrázku 5)

4.8.1.4 Měření ROS a NO

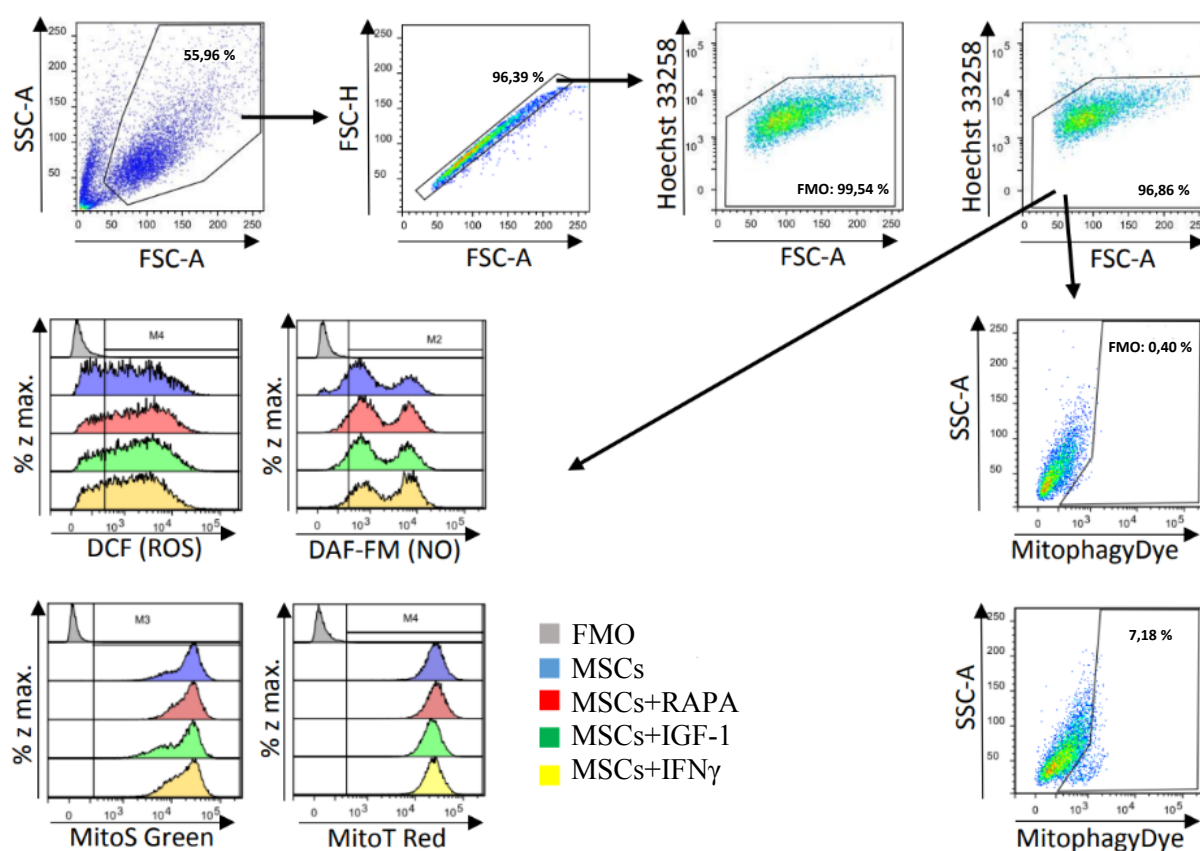
K detekci intracelulárních ROS metodou průtokové cytometrie u MSCs stimulovaných rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ bylo použito činidlo DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; InvitrogenTM; katalogové č.: D399). DCFDA je po vstupu do buňky deacetylováno intracelulárními esterázami a následně oxidováno intracelulárními ROS na DCF (2',7'-dichlorofluorescein) (tabulka 3), který je vysoce fluorescenční.

K detekci NO průtokovou cytometrií byl použit DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein; InvitrogenTM; katalogové č.: D23841). DAF-FM vstupuje do buněk, kde se po reakci s NO přeměňuje na fluorescenční benzotriazol (tabulka 3). Buňky byly připraveny dle následujícího protokolu:

- Odlít médium, přidat 150 μ l DCFDA (100 μ M) pro detekci ROS, nebo 150 μ l DAF-FM (25 μ M) pro detekci NO a inkubovat 30 minut při 37 °C
- 2x promýt PBS
- Přidat do každé jamky 200 μ l trypsinu a inkubovat 7 minut při 37 °C
- Přidat do každé jamky 3 ml RPMI, buňky seškrábat a přenést do zkumavky
- Připravit buňky na měření na průtokovém cytometru (viz protokol výše)
- Měřit na průtokovém cytometru LSR II (gatovací strategie je znázorněna na obrázku 5)

Tabulka 3: Seznam použitých markerů

marker	excitační/emisní spektrum	výrobce	značení
MitophagyDye	530/700 nm	Dojindo	mitofagie
MitoTracker Red CMXRos	581/644 nm	Invitrogen	mitochondrie (potenciál)
MitoTracker Deep Red	644/665 nm	Invitrogen	mitochondrie (potenciál)
MitoSpy Green FM	490/516 nm	BioLegend	mitochondrie (masa)
DCF	492/527 nm	Invitrogen	ROS
DAF-FM	495/515 nm	Invitrogen	NO



Obrázek 5: Ukázka gatovací strategie použité při analýze MSCs; zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama, MitoS Green – MitoSpy Green FM, MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos

4.8.2 Fluorescenční mikroskopie

K vizualizaci uspořádání mitochondrií v různě stimulovaných MSCs byl použit fluorescenční mikroskop Leica Dmi8. Buňky byly připraveny dle následujícího protokolu:

- Odlít médium a promýt PBS
- Přidat 1 ml MitoTracker Red CMXRos (100nM) a inkubovat 30 minut při 37 °C

- 2x promýt PBS, fixovat 10 minut v 500 μ l 4% paraformaldehydu
- Promýt PBS, 2x permeabilizovat (1x10 minut a 1x3 minuty) v 500 μ l 0,2% roztoku Triton X-100 (Merck; katalogové č.: X100) v PBS s 5% bovinním sérovým albuminem
- Přidat 50 μ l primární monoklonální protilátky proti alfa-tubulinu (1:200; InvitrogenTM; katalogové č.: 32-2500) ředěné v roztoku Triton X-100, zakrýt parafilmem a barvit 1 hodinu při pokojové teplotě
- 2x promýt PBS
- Přidat 50 μ l rat anti-mouse sekundární protilátky konjugované s fluorochromem (1:400; InvitrogenTM; katalogové č.: 11-4011-85) ředěné v roztoku Triton X-100, zakrýt parafilmem a barvit 1 hodinu při pokojové teplotě
- 2x promýt PBS
- Dát kapku Mowiolu (Calbiochem, Billerica, Massachusetts, USA; katalogové č.: 47-590-4) s DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) na podložní sklíčko, zakrýt krycím sklíčkem s buňkami a nechat zaschnout 20 minut zakryté v lednici
- Analyzovat na fluorescenčním mikroskopu

4.8.3 WST test

WST test byl použit k měření metabolické aktivity MSCs stimulovaných rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ . Tento test je založen na štěpení tetrazoliové soli WST-1 (Roche; katalogové č.: 5015944001) na barevný formazan mitochondriální sukcinát dehydrogenázou. Příprava probíhala dle následujícího protokolu:

- Přidat do každé jamky WST-1 (1:10)
- Inkubovat 3 hodiny při 37 °C
- Měřit absorbanci na spektrofotometru microplate reader ELx800 při vlnové délce 450 nm

4.8.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction – qPCR) byla použita ke stanovení relativní exprese genů souvisejících s mitochondriální dynamikou, mitofagií, autofagií a glykolýzou u MSCs stimulovaných rapamycinem, IGF-1, IFN γ , nebo oligomycinem.

4.8.4.1 Izolace RNA

RNA bylo z MSCs izolováno dle následujícího protokolu:

- Odebrat médium, přidat 300 μ l TRI reagentu[®] (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, USA; katalogové č.: TR118) do každé jamky a promíchat pomocí pipety
- Přenést buňky v TRI reagentu[®] do mikrozkušavek bez obsahu RNáz a DNáz
- Přidat 60 μ l chloroformu, promíchat a nechat stát 5 minut při pokojové teplotě
- Centrifugovat v chladu (8 °C, 14000 g, 15 minut)
- Horní fázi přepipetovat do čistých mikrozkušavek bez obsahu RNáz a DNáz
- Přidat isopropanol v množství stejném jako je množství odebrané fáze, promíchat
- Nechat stát 8 minut při pokojové teplotě
- Centrifugovat v chladu (8 °C, 14000 g, 8 minut)
- Odebrat supernatant, promýt 20 μ l 70% etanolu
- Vložit mikrozkušavky do termobločku s nastavenou teplotou 40 °C, nechat vyschnout
- Přidat 25 μ l H₂O bez obsahu RNáz
- Vložit mikrozkušavky na 5 minut do termobločku s nastavenou teplotou 65 °C

Čistota izolované RNA a její koncentrace byla detekována s využitím spektrofotometru NanoDrop. Poté byla RNA přepsána reverzní transkripcí do DNA.

4.8.4.2 Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci byl použit kit SuperScript IV RT (Invitrogen[™]; katalogové č.: 18090200). Postupovalo se dle pokynů výrobce:

- K 1 μ g RNA přidat 1 μ l náhodných hexamerů primerů (Thermo Scientific[™]; katalogové č.: SO142) a 1 μ l deoxynukleotidů (Thermo Scientific[™]; katalogové č.: R0192), doplnit do 13 μ l H₂O bez obsahu RNáz
- Vložit směs do thermocycleru a zahřát na 65 °C po dobu 5 minut, poté dát na led
- Přidat 4 μ l 5x SSIV buffer, 1 μ l DTT (dithiothreitol; 0,1 M), 1 μ l RNase inhibitoru (Invitrogen[™]; katalogové č.: 10777019) a 1 μ l SuperScript IV reverzní transkriptázy
- Vložit směs do thermocycleru (10 minut 23 °C, 10 minut 50 °C, 10 minut 80 °C), poté zchladit na 4 °C
- Použít cDNA na qPCR

4.8.4.3 Měření qPCR

Vzorky byly napipetovány do 384-jamkové destičky (BIOplastics, Landgraaf, Nizozemsko) v triplicátech. Měření qPCR probíhalo na přístroji LightCycler 480 II. Pro

všechna měření byl použit 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR supermix (Solid BioDyne, Tartu, Estonsko; katalogové č.: 08-36-00020). Housekeeping geny *ACTB* a *GAPDH* byly vybrány jako kontrola. Všechny použité primery jsou uvedeny v tabulce 4. Vyhodnocení bylo provedeno metodou relativní kvantifikace. Reakce proběhla dle následujícího protokolu:

- Každý vzorek připravit smícháním 1 μ l cDNA, 1 μ l primerů F (forward) + R (reverse), 2 μ l SYBR a 6 μ l H₂O bez obsahu RNáz
- Preinkubace: 10 minut při 95 °C
- 50 cyklů s profilem: 10 sekund 95 °C, 30 sekund 60 °C, 1 sekunda 72 °C
- Zchlazení na 40 °C

Tabulka 4: Seznam použitých primerů

gen	sekvence primeru	
	forward	reverse
<i>ACTB</i>	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
<i>GAPDH</i>	GCCAAGGTCATCCATGACAAC	GTCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>PPARG</i>	GGAAGACCACTCGCATTCCTT	GTAATCAGCAACCATTGGGTCA
<i>MFN1</i>	CCTACTGCTCCTTCTAACCCA	AGGGACGCCAATCCTGTGA
<i>MFN2</i>	AGAAGTGGACCCGGTTACCA	CACTTCGCTGATACCCCTGA
<i>OPA1</i>	TGGAATAATGGTTCGAGAGTCAG	CATTCCGTCTCTAGGTTAAAGCG
<i>DRP1</i>	CAGGAATTGTTACGGTTCCTAA	CCTGAATTAAGTGTCCCGTGA
<i>HK1</i>	CGGAATGGGGAGCCTTTGG	GCCTTCCTTATCCGTTTCAATGG
<i>PFKFB1</i>	ATGAGCTGCCCTATCTCAAGT	GTCCCGGTGTGTGTTACAG
<i>H6PD</i>	ATGAAGCACACAGGCATTTGG	TCCAGGTATAGCTGAAACAGTCC
<i>TIMM23</i>	GAAGGTGGCGGAAGAAGTAGC	GGGGGTTTCATACCAGTCAGC
<i>PINK1</i>	GGCTTCCGTCTGGAGGATTAT	AACCTGCCGAGATATTCCACA
<i>MAP1LC3A</i>	GACCGCTGTAAGGAGGTGC	CTTGACCAACTCGCTCATGTTA
<i>MAP1LC3B</i>	TTATAGAGCGATAACAAGGGGGAG	CGCCGTCTGATTATCTTGATGAG

4.8.5 Měření metabolické aktivity s využitím Seahorse analyzáru

Agilent Seahorse XF HS Mini analyzáru byl využit k měření metabolické aktivity MSCs stimulovaných 48 hodin IGF-1, nebo oligomycinem. Příprava probíhala dle následujícího protokolu:

- Den před měřením hydratovat kazetu přidáním 200 μ l destilované H₂O do každé jamky, zakrýt parafilmem a vložit na 24 hodin do inkubátoru bez CO₂ nastaveného na 37 °C

- V den měření nahradit vodu v kazetě kalibrantem (Agilent Technologies; katalogové č.: 103059-000) zahřátým na 37 °C, inkubovat kazetu 1 hodinu při 37 °C v inkubátoru bez CO₂
- Promýt buňky 200 µl média Seahorse XF DMEM, následně napipetovat do každé jamky 180 µl tohoto média a inkubovat 1 hodinu při 37 °C v inkubátoru bez CO₂
- Naředit v Seahorse XF DMEM inhibitory obsažené v Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit (Agilent Technologies; katalogové č.: 103591-100)
 - Oligomycin (15 µM) – inhibitor ATP syntázy
 - Rotenon + antimycin A (5 µM) – inhibitory komplexu I a komplexu III
- Napipetovat 20 µl oligomycinu do portu A a 22 µl rotenonu + antimycin A do portu B
- Vložit kazetu do Seahorse analyzáru pro kalibraci přístroje
- Promýt buňky médiem Seahorse XF DMEM, doplnit všechny jamky na 180 µl
- Analyzovat buňky s využitím Seahorse analyzáru

4.8.5.1 BCA metoda

Celková koncentrace proteinů v buňkách byla stanovena použitím BCA metody a následně byla využita pro normalizaci dat získaných měřeními na Seahorse analyzáru.

Příprava probíhala podle následujícího protokolu:

- Odlít médium a 2x promýt PBS
- Do každé jamky napipetovat 100 µl činidla připraveného smícháním reagentu B, reagentu C a reagentu A (24:1:25)
- Inkubovat 30 minut při 60 °C
- Přenést obsah jamek do 96-jamkové destičky
- Měřit absorbanci na spektrofotometru microplate reader ELx800 při vlnové délce 562 nm

4.9 Analýza splenocytů

4.9.1 Izolace splenocytů

Slezina odebraná z myši inbredního kmene BALB/c byla mechanicky homogenizována, přefiltrována přes nylonovou gázu do zkumavky a centrifugována (8 °C, 170 g, 8 minut). Po resuspendování pelety v RPMI byly splenocyty spočítány s využitím Bürkerovy komůrky.

4.9.2 Kokultivace MSCs a splenocytů

Stimulované MSCs byly po odlití média promyty PBS a barveny v 1 ml MitoTracker Red CMXRos (100 nM), nebo MitoTracker Deep Red (100 nM; Invitrogen™; katalogové č.: M22426) (tabulka 3) 30 minut při 37 °C. Poté byly MSCs 2x promyty PBS a do každé jamky bylo přidáno 200 µl trypsinu. Po 7 minutách byly do jamek napipetovány 3 ml RPMI. Buňky byly seškrábány škrabkou, přeneseny do zkumavek a centrifugovány (8 °C, 170 g, 8 minut). Supernatant byl odlit a MSCs byly spočítány pomocí Bürkerovy komůrky.

MSCs a splenocyty v poměru 1:20 byly nasazeny do 24-jamkové destičky v celkovém objemu 1 ml RPMI. Buňky byly kokultivovány při 37 °C v inkubátoru s 5% CO₂ po dobu 45 minut nebo 48 hodin pro analýzu mitochondriálního přenosu, 48 hodin pro měření intracelulárních cytokinů, nebo 72 hodin pro měření transkripčních faktorů. Splenocyty použité na 48hodinovou a 72hodinovou kokultivaci byly po nasazení stimulovány konkanavalinem A (1,25 µg/ml; Merck; katalogové č.: C2010).

4.9.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla použita pro analýzu přenosu mitochondrií z MSCs do splenocytů, dále pro měření intracelulárních cytokinů a transkripčních faktorů.

4.9.3.1 Měření přenosu mitochondrií z MSCs do splenocytů

Splenocyty kokultivované s různě stimulovanými MSCs po dobu 45 minut nebo 48 hodin byly připraveny pro analýzu mitochondriálního přenosu dle následujícího protokolu:

- Celou přípravu provádět na ledě
- Jamky doplnit PBS, buňky seškrábat škrabkou a přenést do zkumavky
- Jamky 2x opláchnout PBS a přenést obsah do zkumavky
- Centrifugovat (8 °C, 170 g, 8 minut)
- Odlít supernatant a resuspendovat buňky v 200 µl PBS
- Přenést buňky do 96-jamkové destičky s kulatým dnem v objemu 200 µl na jamku
- Centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty) a poté rozvolnit peletu použitím vortexu
- Přidat 10 µl naředěné monoklonální protilátky proti povrchovému znaku konjugované s fluorochromem (tabulka 5) pro rozlišení vybraných populací splenocytů (CD4⁺, CD8a⁺, CD19⁺, CD11b⁺), inkubovat 30 minut ve tmě při 4 °C
- 2x promýt 200 µl PBS a centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty)
- Do každé jamky přidat 200 µl PBS, obarvit mrtvé buňky 20 µl Hoechst 33258 (1:40 000)

- Měřit na průtokovém cytometru LSR II (gatovací strategie je znázorněna na obrázku 7)

4.9.3.2 Měření intracelulárních cytokinů a transkripčních faktorů

Splenocyty kokultivované 48 hodin s MSCs stimulovanými IGF-1, nebo oligomycinem byly použity pro analýzu intracelulárních cytokinů metodou průtokové cytometrie. Buňky byly připraveny dle následujícího protokolu:

- 4,5 hodiny před měřením stimulovat buňky PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 20 ng/ml; Merck; katalogové č.: P8139), ionomycinem (500 ng/ml; Merck; katalogové č.: I0634) a brefeldinem A (5 µg/ml; InvitrogenTM; katalogové č.: 00-4506-51)
- Destičku přenést na led, buňky seškrábat škrabkou a přenést do zkumavky
- Jamky 2x opláchnout PBS a přenést obsah do zkumavky
- Centrifugovat (8 °C, 170 g, 8 minut)
- Odlít supernatant a resuspendovat buňky v potřebném množství PBS
- Přenést buňky do 96-jamkové destičky s kulatým dnem v objemu 200 µl na jamku
- Centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty) a poté rozvolnit peletu použitím vortexu
- Barvit buňky v 10 µl naředěných monoklonálních protilátek proti povrchovým znakům (tabulka 5) pro rozlišení vybraných populací splenocytů (CD4⁺, CD8a⁺) a jejich aktivace (CD25) společně s Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (1:1000; InvitrogenTM; katalogové č.: L34955) pro označení mrtvých buněk, inkubovat 30 minut ve tmě při 4 °C
- Promýt 200 µl PBS a centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty)
- Přidat do každé jamky 100 µl fixačního roztoku z eBioscienceTM Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set (InvitrogenTM; katalogové č.: 88-8824-00), inkubovat 30 minut ve tmě (10 minut na ledě a poté 20 minut při pokojové teplotě)
- Přidat do každé jamky 100 µl permeabilizačního roztoku (1:10; eBioscienceTM Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set) v PBS
- Centrifugovat destičku (23 °C, 300 g, 4 minuty)
- Přidat 200 µl permeabilizačního roztoku a centrifugovat destičku (23 °C, 300 g, 4 minuty)
- Barvit buňky v 10 µl naředěné monoklonální protilátky proti intracelulárnímu znaku (tabulka 5) v permeabilizačním roztoku po dobu 30 minut ve tmě při pokojové teplotě
- 2x promýt 200 µl permeabilizačního roztoku a centrifugovat destičku (23 °C, 300 g, 3 minuty), poté do každé jamky přidat 200 µl permeabilizačního roztoku
- Měřit na průtokovém cytometru LSR II (gatovací strategie je znázorněna na obrázku 21)

Pro detekci transkripčních faktorů průtokovou cytometrií byly použity splenocyty kokultivované po dobu 72 hodin s MSCs stimulovanými IGF-1, nebo oligomycinem. Příprava buněk probíhala dle následujícího protokolu:

- Destičku přenést na led, buňky seškrábat škrabkou a přenést do zkumavky
- Jamky 2x opláchnout PBS a přenést obsah do zkumavky
- Centrifugovat (8 °C, 170 g, 8 minut)
- Odlít supernatant a resuspendovat buňky v potřebném množství PBS
- Přenést buňky do 96-jamkové destičky s kulatým dnem v objemu 200 µl na jamku
- Centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty) a poté rozvolnit peletu použitím vortexu
- Barvit buňky v 10 µl naředěné monoklonální protilátky proti povrchovému znaku (tabulka 5) pro rozlišení vybraných populací splenocytů (CD4⁺, CD8a⁺) společně s Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (1:1000) pro označení mrtvých buněk, inkubovat 30 minut ve tmě při 4 °C
- Promýt 200 µl PBS a centrifugovat destičku (8 °C, 170 g, 3 minuty)
- Fixovat buňky ve 100 µl roztoku fixačního koncentrátu ve fixačním diluentu (1:3; eBioscience™ Fcγ3/Transcription Factor Staining Buffer Set; Invitrogen™; katalogové č.: 00-5523-00)
- Permeabilizovat buňky a barvit intracelulární znaky stejně jako při přípravě buněk na měření intracelulárních cytokinů (viz protokol výše)
- Měřit na průtokovém cytometru LSR II (gatovací strategie je znázorněna na obrázku 21)

Tabulka 5: Seznam monoklonálních protilátek použitých při analýze splenocytů

znak	fluorochrom	ředění	klon	výrobce	katalogové č.	značení
CD45	A700	1:200	30-F11	BioLegend	103128	povrch
CD4	FITC	1:150	GK1.5	BioLegend	100405	povrch
CD8a	FITC	1:160	53-6.7	BioLegend	100705	povrch
CD8a	APC	1:160	53-6.7	BioLegend	100712	povrch
CD11b	APC	1:100	M1/70	BioLegend	101212	povrch
CD19	FITC	1:90	6D5	BioLegend	115505	povrch
CD25	APC	1:200	PC61.5	eBioscience	17-0251-82	povrch
IL-2	APC	1:100	JES6-5H4	Invitrogen	17-7021-82	intracelulární
IL-17A	APC	1:70	eBio17B7	eBioscience	17-7177-81	intracelulární
IL-10	APC	1:80	JES5-16E3	BioLegend	505010	intracelulární
Ki-67	PE	1:150	SolA15	Invitrogen	12-5698-82	intracelulární
Foxp3	PE	1:100	FJK-16s	eBioscience	12-5773-82	intracelulární
ROR γ t	PE	1:80	AFKJS-9	Invitrogen	12-6988-82	intracelulární

4.10 Statistická analýza

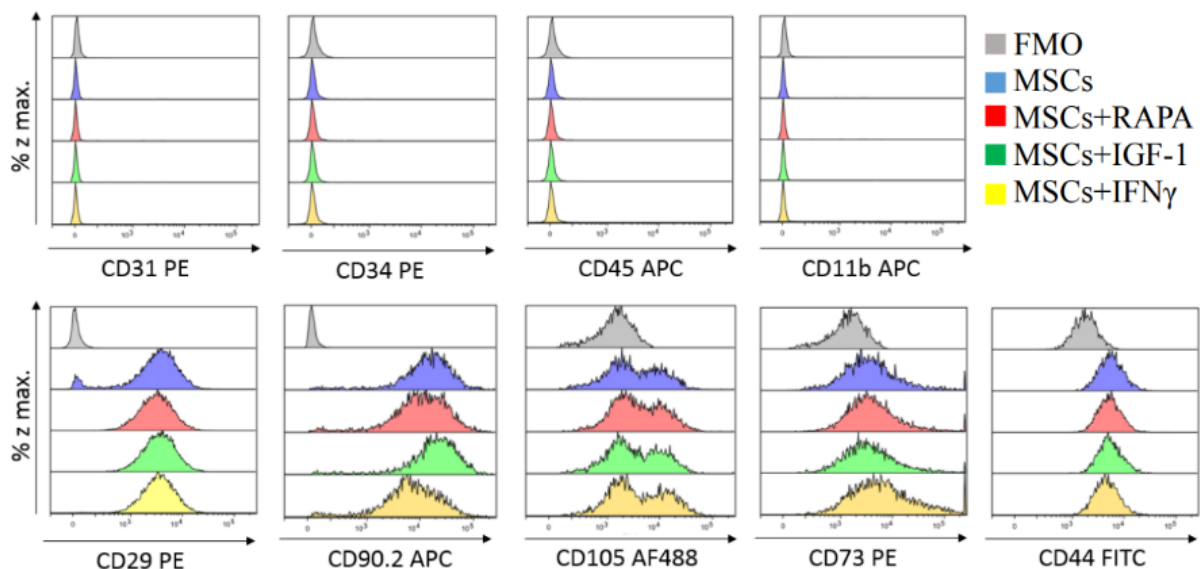
Statistická analýza získaných dat byla provedena s využitím programu GraphPad Prism 8. Ze statistických metod byla použita jednosměrná ANOVA, nebo párový t-test. Hodnoty statistické odchylky */x/# $p \leq 0,05$, **/xx/## $p \leq 0,01$, ***/xxx/### $p \leq 0,001$, ****/xxxx/#### $p \leq 0,0001$ byly považovány za signifikantní.

5 Výsledky

5.1 První část

5.1.1 Fenotypizace MSCs

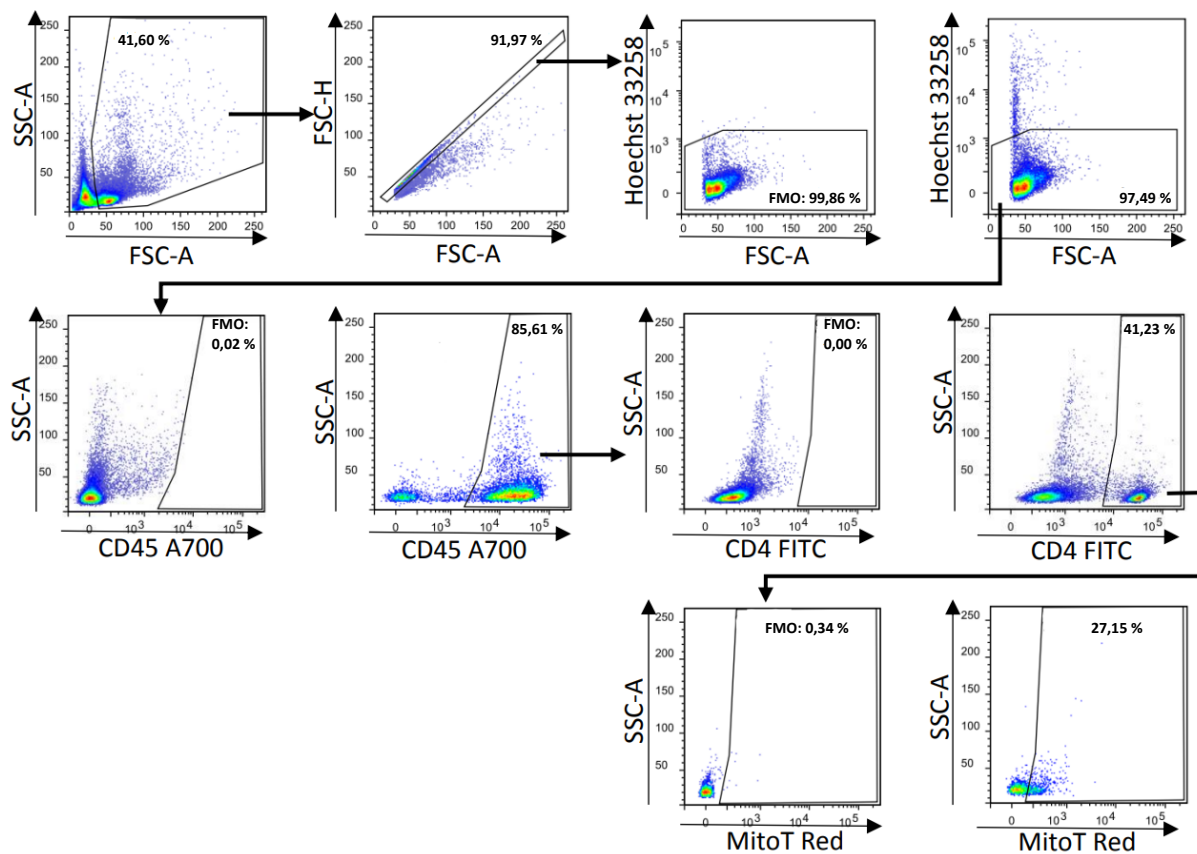
Nejprve jsme chtěli prokázat, že buňky používané v našich experimentech splňují charakterizaci MSCs. Zajímalo nás také, zda stimulace MSCs rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ po dobu 24 hodin má vliv na jejich fenotyp. Detekce exprese povrchových znaků s využitím průtokové cytometrie ukázala, že námi používané MSCs jsou pozitivní na CD29, CD90.2 a slabě pozitivní na CD105, CD73 a CD44 (vše markery MSCs). Naopak tyto buňky na svém povrchu neexprimují CD31, CD34, CD45 a CD11b, což jsou znaky hematopoetických buněk. Zároveň tyto výsledky ukazují, že stimulace MSCs expresi výše zmíněných povrchových znaků neovlivňuje (obrázek 6).



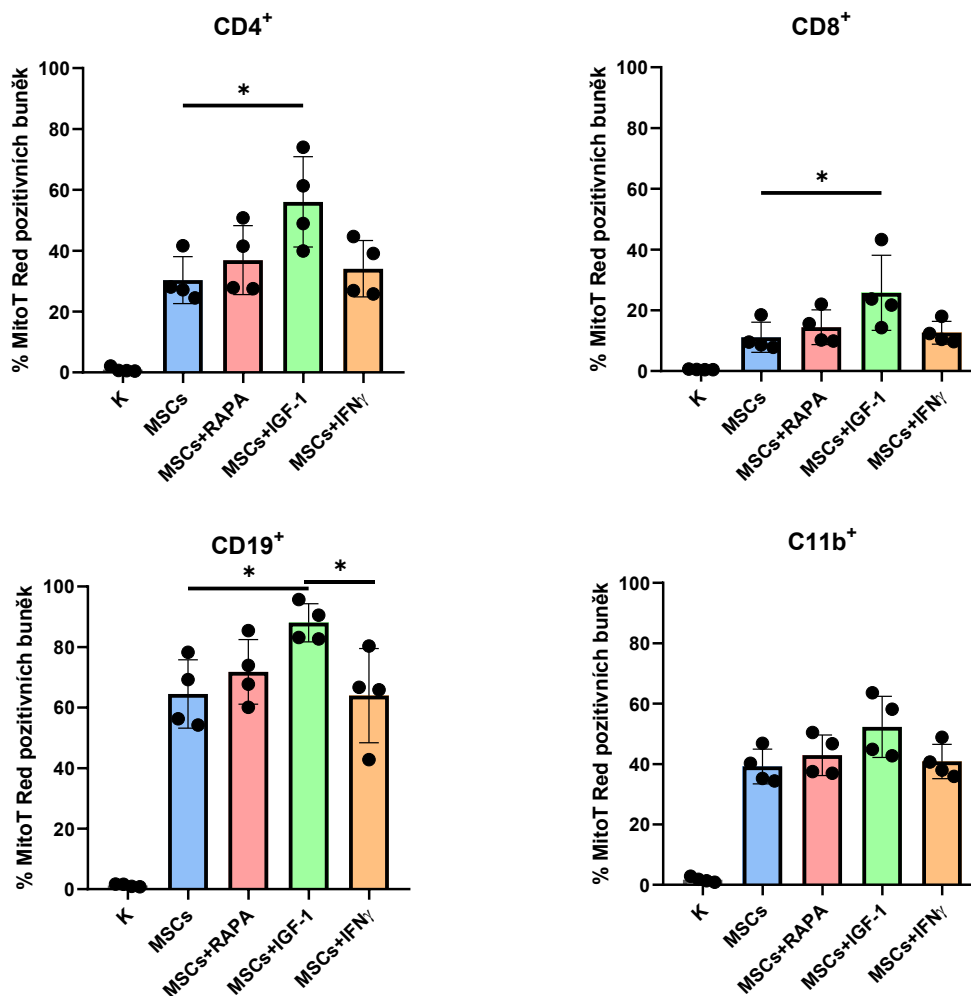
Obrázek 6: Exprese povrchových znaků MSCs. Reprezentativní histogramy znázorňující expresi molekul CD31, CD34, CD45, CD11b, CD29, CD90.2, CD105, CD73 a CD44 na povrchu MSCs nestimulovaných a MSCs stimulovaných RAPA, IGF-1, nebo IFN γ . Měřeno průtokovou cytometrií. Zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama

5.1.2 Mitochondriální přenos z MSCs do splenocytů

Mitochondriální přenos z MSCs do imunitních buněk byl u nás v laboratoři několikrát potvrzen. V tomto projektu nás zajímalo, zda stimulace MSCs indukuje nějaké změny v přenosu mitochondrií. MSCs ovlivněné po dobu 24 hodin rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ byly barveny MitoTrackerem Red CMXRos. Následně byly 45 min kokultivovány se splenocyty v poměru 1:20. Přenos mitochondrií byl detekován metodou průtokové cytometrie, použitá gatovací strategie je znázorněna na obrázku 7. Výsledky ukazují nárůst mitochondriálního přenosu po stimulaci MSCs IGF-1, a to do všech vybraných populací imunitních buněk (CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CD11b $^{+}$, CD19 $^{+}$) (obrázek 8). Vyjma CD11b $^{+}$ buněk je rozdíl signifikantní.



Obrázek 7: Ukázka gatovací strategie mitochondriálního přenosu z MSCs do splenocytů. Ukázáno na CD4 $^{+}$ T-lymfocytech, ostatní populace byly gatovány stejně. Zkratky: MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos

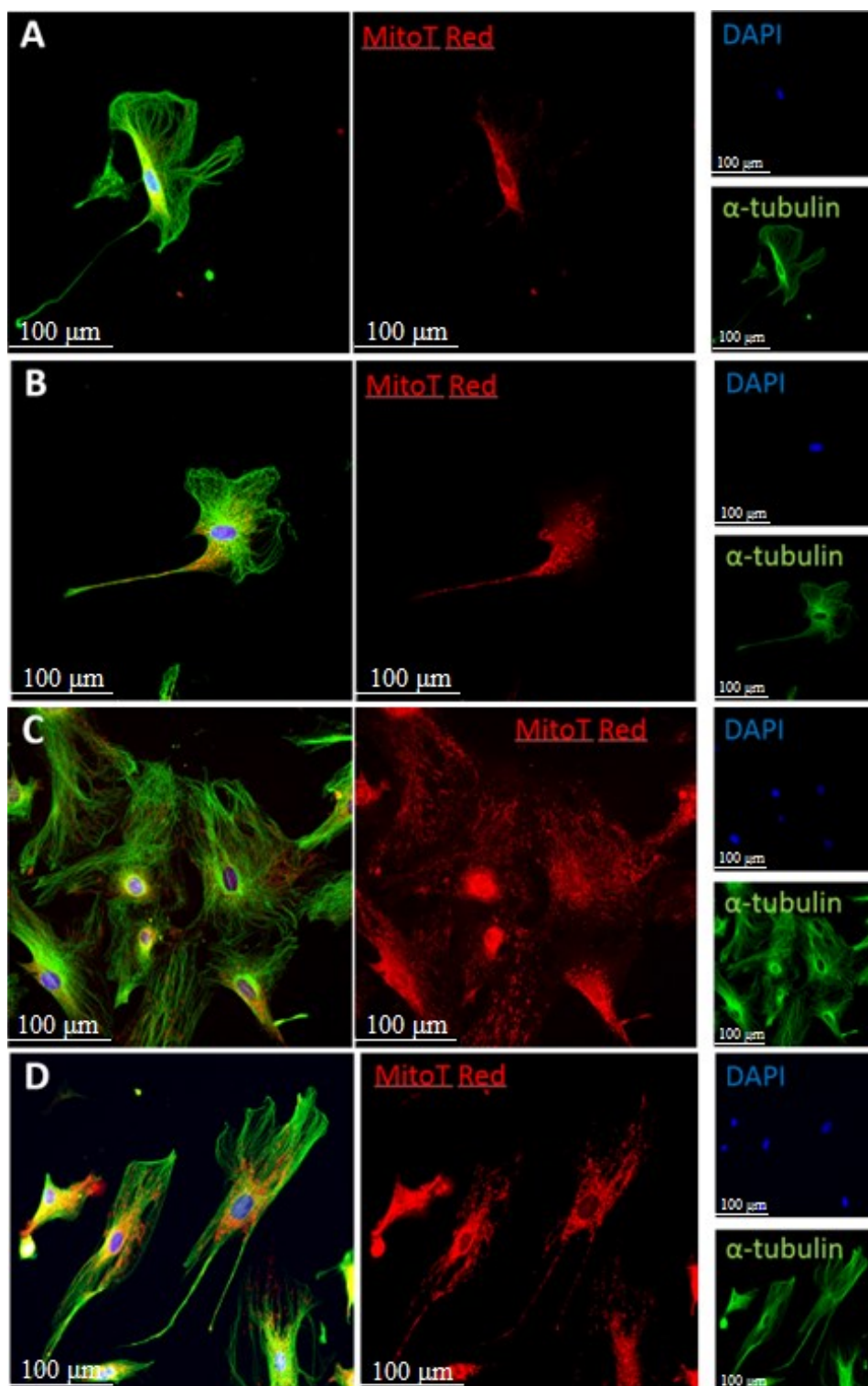


Obrázek 8: Vliv stimulace MSCs na přenos mitochondrií do vybraných populací imunitních buněk. Měřeno průtokovou cytometrií. Grafy ukazují procentuální zastoupení MitoT Red pozitivních buněk. Výsledky ze 4 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, $*p \leq 0,05$ představuje statisticky významnou odchylku. Zkratky: K – splenocyty kultivované bez přítomnosti MSCs, RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama, MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos

5.1.3 Uspořádání mitochondrií v MSCs

Poté, co jsme zjistili, že MSCs stimulované IGF-1 vykazují vyšší mitochondriální přenos ve srovnání s nestimulovanou kontrolou, nás zajímalo, čím se tyto buňky liší. Jelikož pozice mitochondrií a jejich struktura mají vliv na schopnost předávat mitochondrie, rozhodli jsme se podívat se na uspořádání mitochondrií v MSCs stimulovaných 24 hodin rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ s využitím fluorescenční mikroskopie. Zjistili jsme, že nestimulované MSCs mají mitochondrie uspořádané převážně kolem jádra (obrázek 9 – A), stejné uspořádání mitochondrií bylo pozorováno také u MSCs stimulovaných IFN γ (obrázek 9 – D). Oproti tomu MSCs ovlivněné IGF-1 mají mitochondrie rozptřené po celé buňce (obrázek 9 – C). Mitochondrie

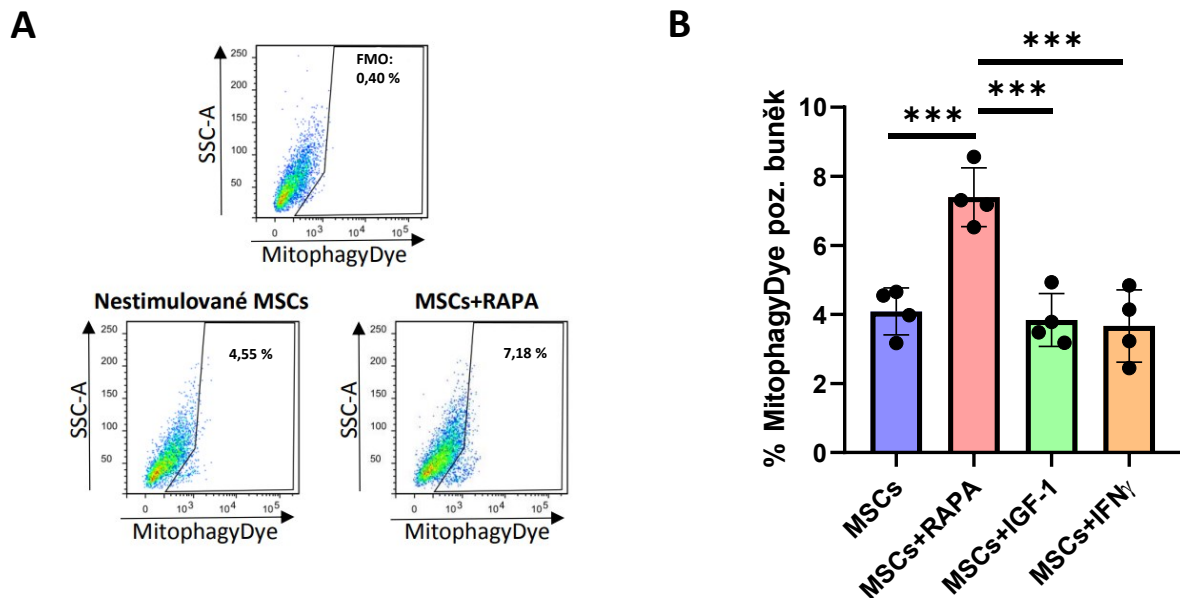
MSCs stimulovaných rapamycinem jsou kulatého tvaru a vypadá to, že v těchto buňkách probíhá mitofagie (obrázek 9 – B).



Obrázek 9: Vliv stimulace na uspořádání mitochondrií v MSCs. Fluorescenční mikroskopické obrázky: A – nestimulovaná kontrola, B – MSCs stimulované rapamycinem, C – MSCs stimulované IGF-1, D – MSCs stimulované IFN γ . Jádra barvena DAPI (modrá), mitochondrie barveny MitoT Red (červená), α -tubulin barven s využitím primární a sekundární protilátky (zelená). Zkratky: MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos

5.1.4 Mitofagie v MSCs

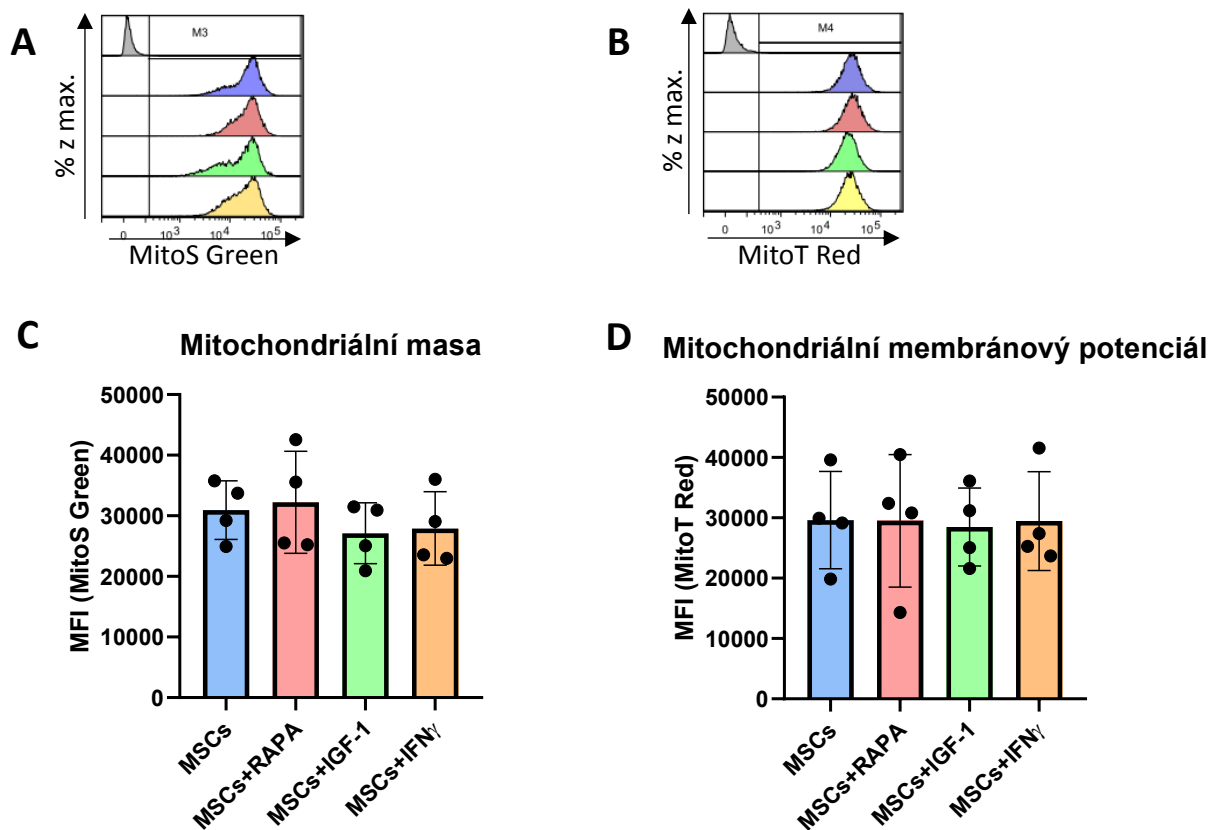
Výsledky z fluorescenční mikroskopie poukazují na možnou probíhající mitofagii v MSCs ovlivněných rapamycinem. Abychom to potvrdili, měřili jsme mitofagii s využitím Mitophagy detection kit a průtokové cytometrie. Ze získaných výsledků vyplývá, že mitofagie v MSCs je celkově velmi nízká. Po stimulaci MSCs rapamycinem dochází k signifikantnímu nárůstu oproti ostatním skupinám (obrázek 10).



Obrázek 10: Vliv stimulace MSCs na mitofagii. Měřeno průtokovou cytometrií. A – ukázka dotplotů zobrazujících mitofagii; B – kvantifikace. Graf ukazuje procentuální zastoupení MitophagyDye pozitivních buněk. Výsledky ze 4 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, *** $p \leq 0,001$ představuje statisticky významnou odchylku. Zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama

5.1.5 Mitochondriální masa a membránový potenciál mitochondrií MSCs

Z předchozích experimentů víme, že rapamycin aktivuje v MSCs mitofagii. O IGF-1 je naopak známo, že podporuje biogenezi mitochondrií. Oba tyto mechanismy se podílejí na regulaci množství a kvality mitochondrií v buňce. Z toho důvodu jsme se rozhodli v MSCs stimulovaných 24 hodin rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ měřit mitochondriální masu a mitochondriální membránový potenciál. Mitochondrie MSCs byly barveny MitoSpy Green FM (masa), nebo MitoTracker Red CMXRos (membránový potenciál). Buňky byly poté analyzovány na průtokovém cytometru. K našemu překvapení nebyla detekována změna mitochondriální masy ani mitochondriálního membránového potenciálu po žádné ze stimulací (obrázek 11).

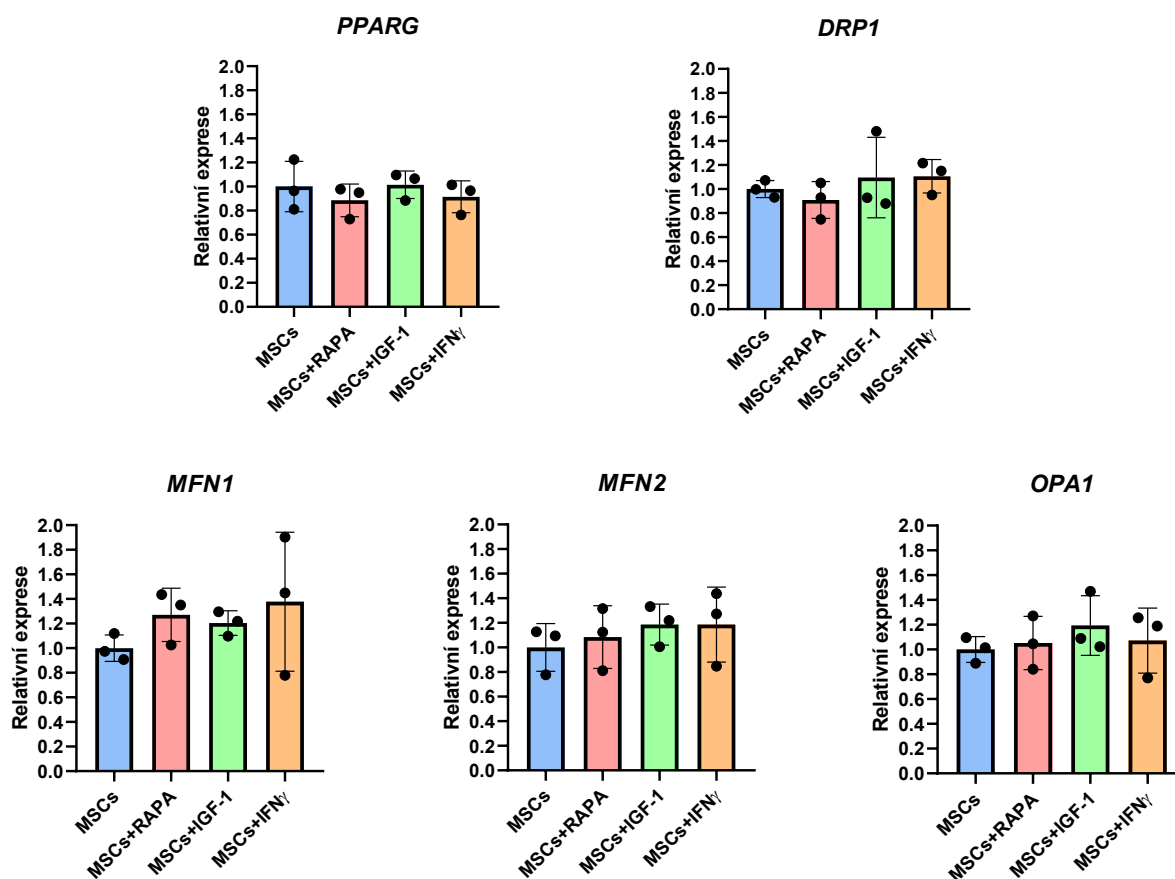


Obrázek 11: Vliv stimulace na mitochondriální masu a mitochondriální membránový potenciál MSCs. Měřeno průtokovou cytometrií. A, B – ukázka histogramů zobrazujících mitochondriální masu, nebo mitochondriální membránový potenciál. C, D – kvantifikace. Grafy ukazují MFI MitoS Green, nebo MitoT Red. Výsledky ze 4 nezávislých experimentů. Zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama, MitoS Green – MitoSpy Green FM, MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos, MFI – mean fluorescence intensity

5.1.6 Mitochondriální dynamika u MSCs

Abychom zjistili, zda IGF-1 podporuje biogenezi mitochondrií v MSCs, měřili jsme s využitím qPCR relativní expresi genu *PPARG*. Z výsledků je patrné, že po 24hodinové stimulaci MSCs ke změně exprese *PPARG* nedochází (obrázek 12). Aktivaci mitochondriální biogeneze u MSCs ovlivněných IGF-1 jsme tudíž nepotvrdili.

Mitochondriální dynamika také hraje roli v mitochondriálním přenosu. Předpokládá se, že spíše jsou přenášeny mitochondrie oddělené než dlouhá mitochondriální síť. Zajímalo nás tedy, zda stimulace MSCs po dobu 24 hodin rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ má na mitochondriální dynamiku vliv. Metodou qPCR jsme detekovali relativní expresi *MFN1*, *MFN2* a *OPA1*, genů asociovaných s fúzí mitochondrií, a genu *DRP1* asociovaného s mitochondriálním dělením. Stejně jako v případě *PPARG*, exprese těchto genů se po stimulaci MSCs výrazně nemění (obrázek 12).

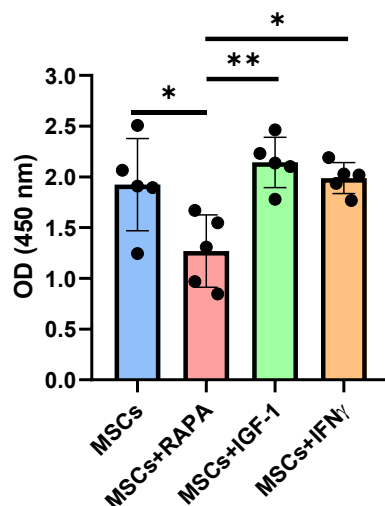


Obrázek 12: Vliv stimulace MSCs na expresi genů asociovaných s biogenezí, fúzí a dělením mitochondrií. Relativní exprese genů byla stanovena pomocí qPCR. Jako kontrola byla použita exprese genů *ACTB* a *GAPDH*. Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama

5.1.7 Metabolismus MSCs

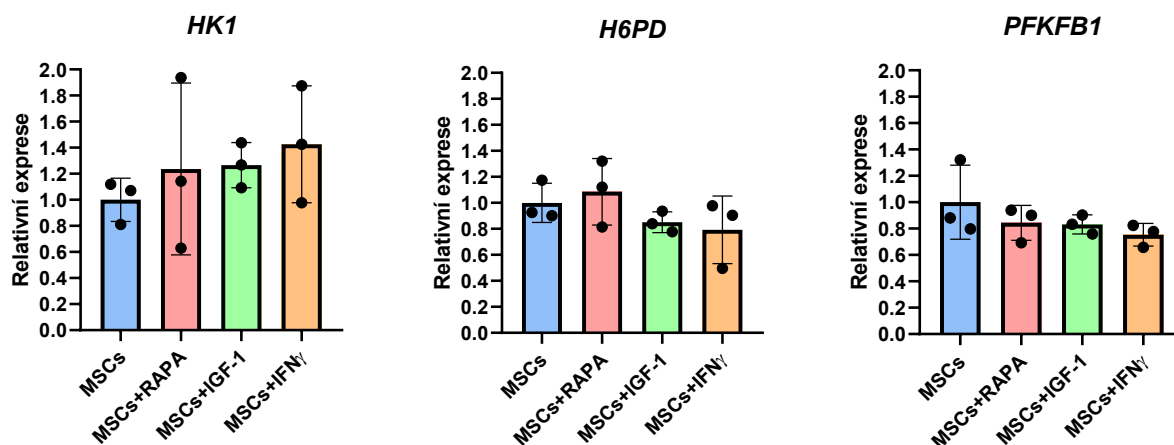
Dále nás zajímalo, jestli má stimulace MSCs rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ po dobu 24 hodin vliv na metabolickou aktivitu MSCs.

Aktivita mitochondriální sukcinát dehydrogenázy byla stanovena pomocí WST testu. Výsledky ukazují signifikantní snížení aktivity enzymu sukcinát dehydrogenázy u MSCs stimulovaných rapamycinem ve srovnání s nestimulovanými MSCs a MSCs ovlivněnými IGF-1, nebo IFN γ (obrázek 13).



Obrázek 13: Vliv stimulace na aktivitu sukcinát dehydrogenázy v MSCs. Měřeno pomocí WST testu. Výsledky z 5 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ představují statisticky významnou odchylku. Zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama, OD – optická denzita

Relativní exprese genů kódujících vybrané enzymy glykolýzy byla stanovena metodou qPCR. Výsledky ukazují, že k žádné výrazné změně v expresi genů *HK1*, *PFKFB1* a *H6PD* po žádné ze stimulací nedochází (obrázek 14).



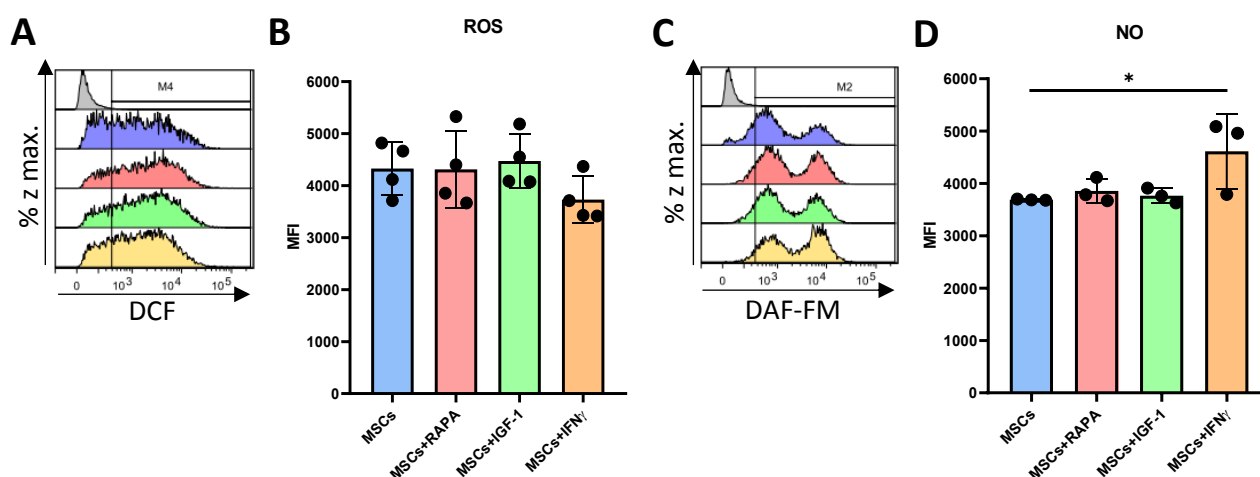
Obrázek 14: Vliv stimulace MSCs na expresi genů asociovaných s glykolýzou. Exprese genů byla stanovena pomocí qPCR. Jako kontrola byla použita exprese genů *ACTB* a *GAPDH*. Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama

5.1.8 Produkce ROS a NO MSCs

ROS jsou produkovány převážně v mitochondriích. Jejich hromadění v buňce negativně ovlivňuje kvalitu mitochondrií a celkově stav buňky. Chtěli jsme proto vědět, zda má 24hodinová stimulace MSCs rapamycinem, IGF-1, nebo IFN γ vliv na produkci intracelulárních

ROS. Výsledky z průtokové cytometrie ukazují, že se tvorba ROS v MSCs po žádné ze stimulací výrazně nemění (obrázek 15 – A, B).

S využitím průtokové cytometrie jsme detekovali také produkci NO. NO produkovaný MSCs je považován za imunosupresivní molekulu. Zajímalo nás tedy, jestli se po ovlivnění MSCs IFN γ , který podporuje jejich imunomodulační působení, tvorba NO zvyšuje. Na základě získaných výsledků jsme toto tvrzení potvrdili – pozorovali jsme signifikantní nárůst tvorby NO u MSCs stimulovaných IFN γ oproti MSCs nestimulovaným (obrázek 15 – C, D).



Obrázek 15: Vliv stimulace MSCs na produkci ROS a NO. Měřeno průtokovou cytometrií. A – ukázka histogramů zobrazujících tvorbu ROS. B – kvantifikace. Graf ukazuje MFI DCF (marker produkce ROS). Výsledky ze 4 nezávislých experimentů. C – ukázka histogramů zobrazujících tvorbu NO. D – kvantifikace. Graf ukazuje MFI DAF-FM (marker produkce NO). Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Dunnettův test, * $p \leq 0,05$ představuje statisticky významnou odchylku. Zkratky: RAPA – rapamycin, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, IFN γ – interferon gama, MFI – mean fluorescence intensity

5.1.9 Shrnutí

V první části tohoto projektu jsme potvrdili, že rapamycin indukuje mitofagii v MSCs. Aktivaci imunomodulačního působení MSCs po stimulaci IFN γ jsme prokázali detekcí tvorby NO. Dále jsme zjistili, že po stimulaci MSCs IGF-1 dochází ke zvýšení mitochondriálního přenosu do imunitních buněk. Aktivaci biogeneze mitochondrií u MSCs ovlivněných IGF-1 se nám však prokázat nepodařilo. Kromě odlišného uspořádání mitochondrií v MSCs po stimulaci IGF-1 jsme nepozorovali nic jiného, čím by se MSCs stimulované IGF-1 lišily od nestimulovaných MSCs či MSCs ovlivněných rapamycinem, nebo IFN γ .

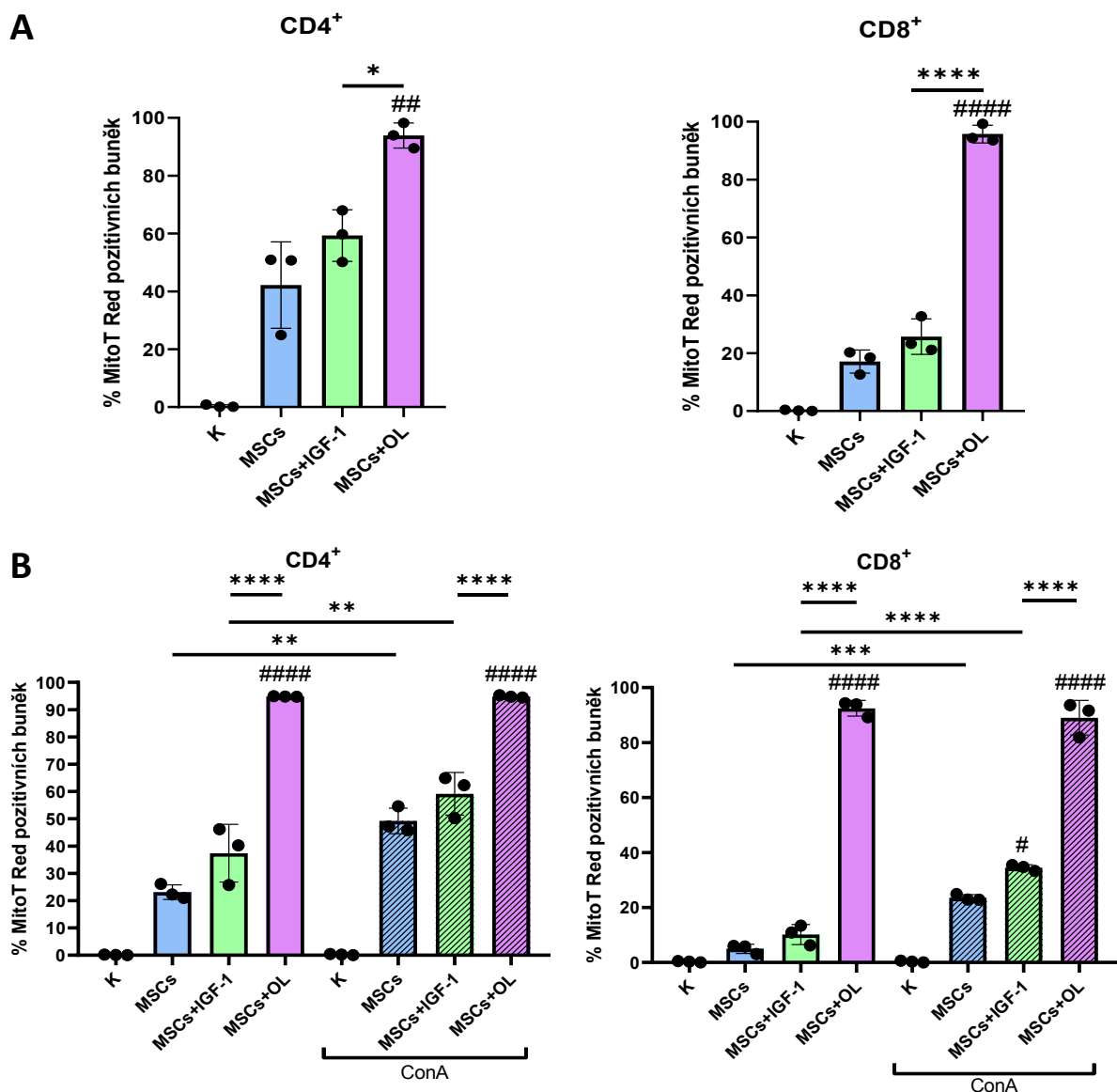
5.2 Druhá část

5.2.1 Mitochondriální přenos z MSCs do splenocytů

Jelikož se nám nepodařilo u MSCs stimulovaných IGF-1 detekovat žádný rozdíl od ostatních měřených skupin, který by vysvětloval jejich zvýšenou schopnost přenášet mitochondrie, rozhodli jsme se znovu zopakovat experiment s mitochondriálním přenosem, abychom se ujistili, že naše původní nastavení stále funguje. Zároveň nás zajímalo, jaký vliv na přenos mitochondrií z MSCs do splenocytů bude mít poškození mitochondrií MSCs.

MSCs byly stimulovány IGF-1, nebo oligomycinem, jenž blokuje funkci mitochondriální ATP syntázy. Na základě optimalizačních kroků jsme dobu stimulace prodloužili na 48 hodin. Následně byly MSCs kokultivovány se splenocyty v poměru 1:20 po dobu 45 minut. Poté byl s využitím průtokové cytometrie detekován mitochondriální přenos. V této části práce jsme se zaměřili pouze na přenos mitochondrií do T-lymfocytů, jelikož vliv MSCs na T-lymfocyty je dobře popsán, a tudíž bylo možné zaměřit se na změny ve specifických parametrech při kultivaci s odlišně ovlivněnými MSCs. Analýza buněk potvrdila nárůst mitochondriálního přenosu po ovlivnění MSCs IGF-1. Velmi nás ale překvapilo, že více než 90 % CD4⁺ a CD8⁺ buněk přijímá mitochondrie od MSCs stimulovaných oligomycinem (obrázek 16 – A).

Z důvodu následujících experimentů zaměřených na analýzu fenotypu T-lymfocytů, které vyžadují kultivaci splenocytů po dobu minimálně 48 hodin, jsme se rozhodli změřit mitochondriální přenos také po 48hodinové kokultivaci. Navíc jsme do kokultivace přidali konkanavalin A pro aktivaci lymfocytů. Ze získaných výsledků vyplývá, že trend naměřený po 48hodinové kokultivaci je stejný jako trend detekovaný po 45minutové kokultivaci. T-lymfocyty aktivované konkanavalinem A přijímají více mitochondrií jak od MSCs nestimulovaných, tak od MSCs stimulovaných IGF-1 ve srovnání s neaktivovanými T-lymfocyty (obrázek 16 – B).

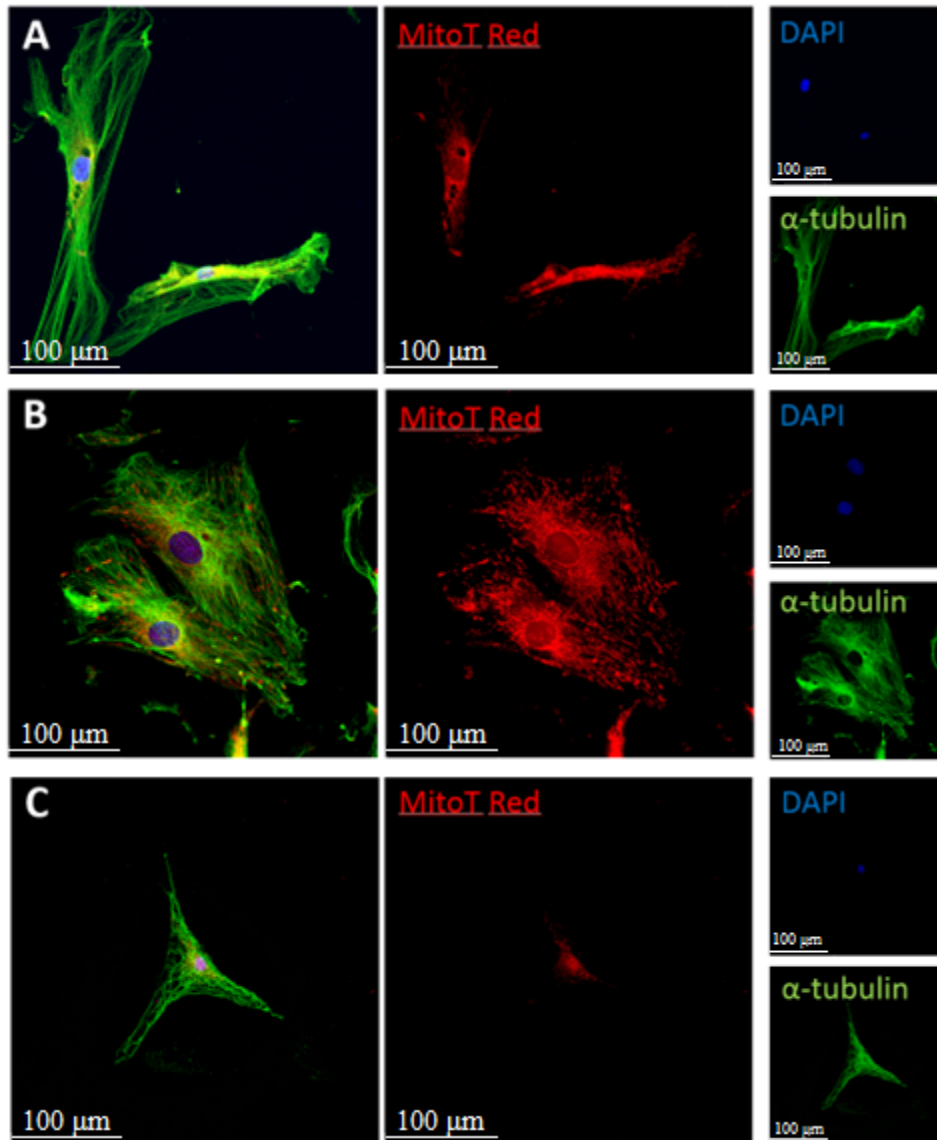


Obrázek 16: Vliv stimulace MSCs na přenos mitochondrií do T-lymfocytů. Měřeno průtokovou cytometrií. Grafy ukazují procentuální zastoupení MitoT Red pozitivních buněk. Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, * $p \leq 0,05$, **/### $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, ****/##### $p \leq 0,0001$ představují statisticky významnou odchylku (# porovnání vůči MSCs dané skupiny). A – měřeno po 45minutové kokultivaci. B – měřeno po 48hodinové kokultivaci. Zkratky: K – splenocyty kultivované bez přítomnosti MSCs, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin, MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos, ConA – konkanavalin A

5.2.2 Uspořádání mitochondrií v MSCs

Poté jsme chtěli vědět, jestli má 48hodinová stimulace oligomycinem nějaký vliv na uspořádání a strukturu mitochondrií v MSCs. Pozorování MSCs fluorescenčním mikroskopem ukázalo kulaté oddělené mitochondrie po stimulaci oligomycinem (obrázek 17 – C). Lépe

patrné bylo oddělení mitochondrií při větším zvětšení (obrázek není ukázán). Uspořádání mitochondrií v MSCs stimulovaných 48 hodin IGF-1 (obrázek 17 – B) je stejné jako po 24hodinové stimulaci (obrázek 9 – C) – oproti mitochondriím neovlivněných MSCs (obrázek 17 – A) jsou mitochondrie MSCs stimulovaných IGF-1 rozprostřeny po celé buňce.



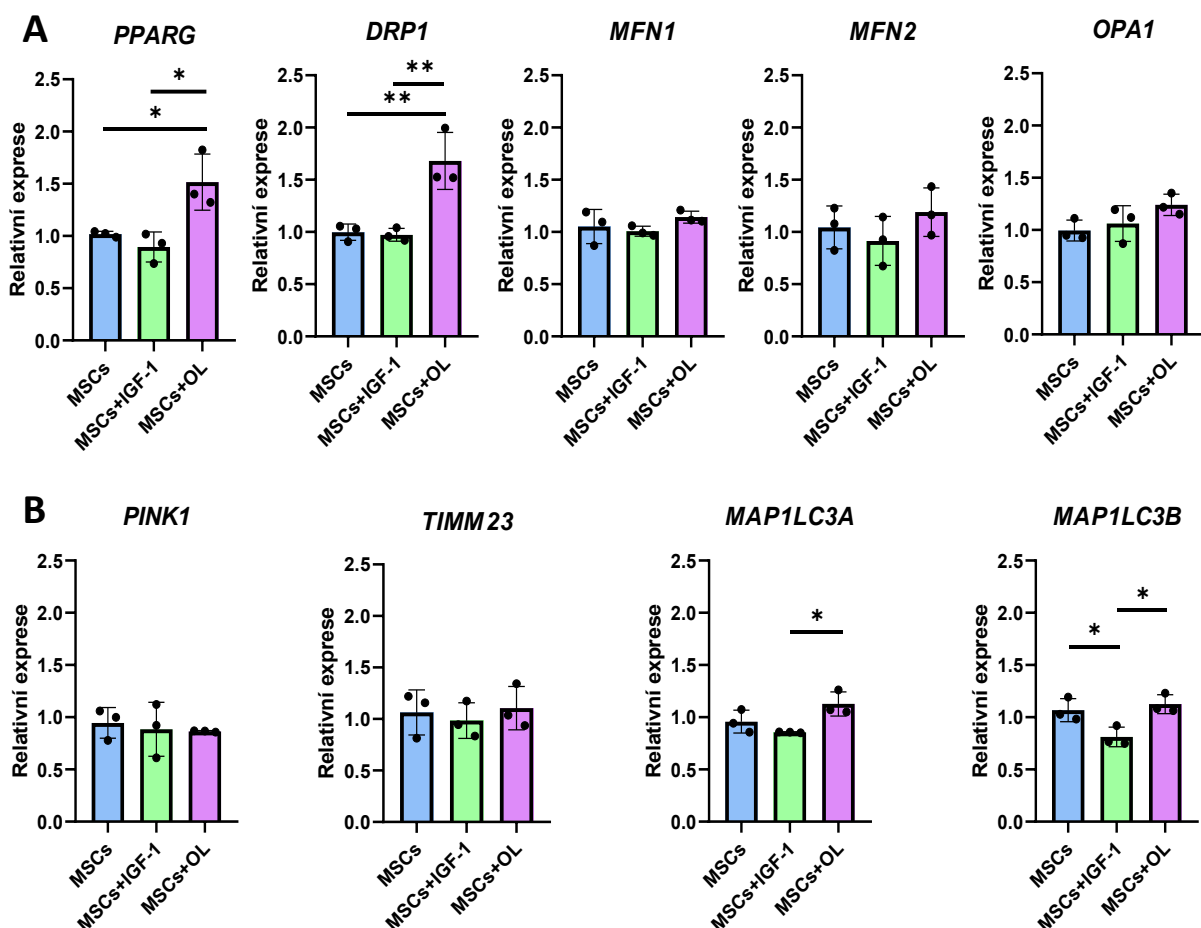
Obrázek 17: Vliv stimulace na uspořádání mitochondrií v MSCs. Fluorescenční mikroskopické obrázky: A – nestimulovaná kontrola, B – MSCs stimulované IGF-1, C – MSCs stimulované oligomycinem. Jádra barvena DAPI (modrá), mitochondrie barveny MitoT Red (červená), α -tubulin barven s využitím primární a sekundární protilátky (zelená). Zkratky: MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos

5.2.3 Mitochondriální dynamika, autofagie a mitofagie v MSCs

Abychom potvrdili výsledky z fluorescenční mikroskopie, rozhodli jsme se u MSCs stimulovaných po dobu 48 hodin IGF-1, nebo oligomycinem detekovat expresi genů

asociovaných s mitochondriální dynamikou. Výsledky ukazují signifikantní nárůst exprese genu *DRP1* asociovaného s dělením mitochondrií po stimulaci MSCs oligomycinem, což odpovídá tomu, co jsme pozorovali při analýze buněk fluorescenčním mikroskopem. Zároveň po stimulaci MSCs oligomycinem dochází k signifikantnímu zvýšení mitochondriální biogeneze (*PPARG*). Expresе genů asociovaných s fúzí mitochondrií (*MFN1*, *MFN2*, *OPA1*) se po žádné ze stimulací výrazně nemění (obrázek 18 – A).

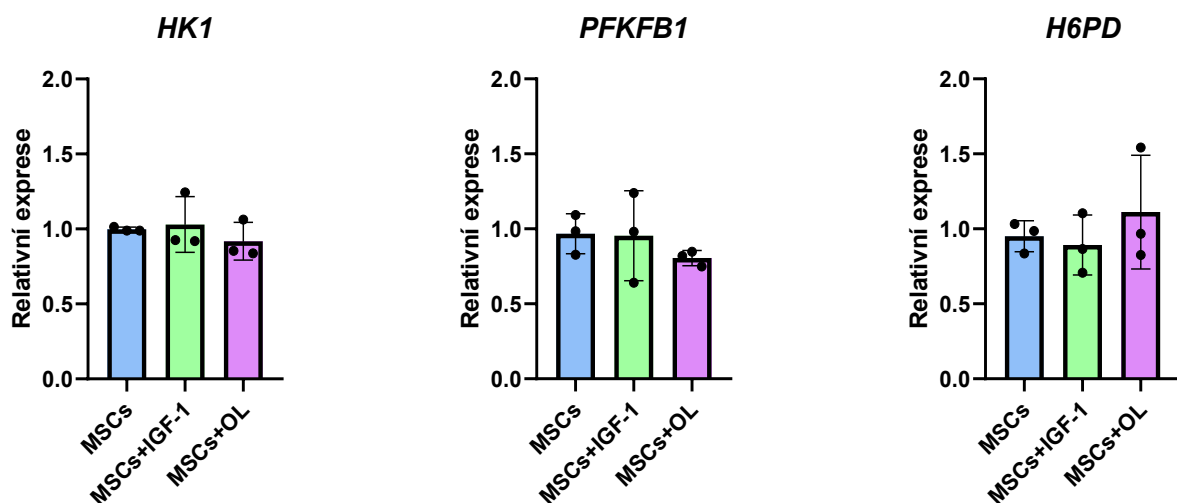
Dále nás zajímalo, zda MSCs ovlivněné oligomycinem aktivují mitofagii, aby se zbavily poškozených mitochondrií. Metodou qPCR jsme detekovali expresi genů pro autofagii (*MAP1LC3A*, *MAP1LC3B*) a mitofagii (*TIMM23*, *PINK1*). Získané výsledky neprokázaly změny v expresi genů *TIMM23* a *PINK1* po ovlivnění MSCs, aktivaci mitofagie po stimulaci oligomycinem jsme tudíž nepotvrdili. Expresе genů asociovaných s autofagií se snižuje po ovlivnění MSCs IGF-1 (obrázek 18 – B).



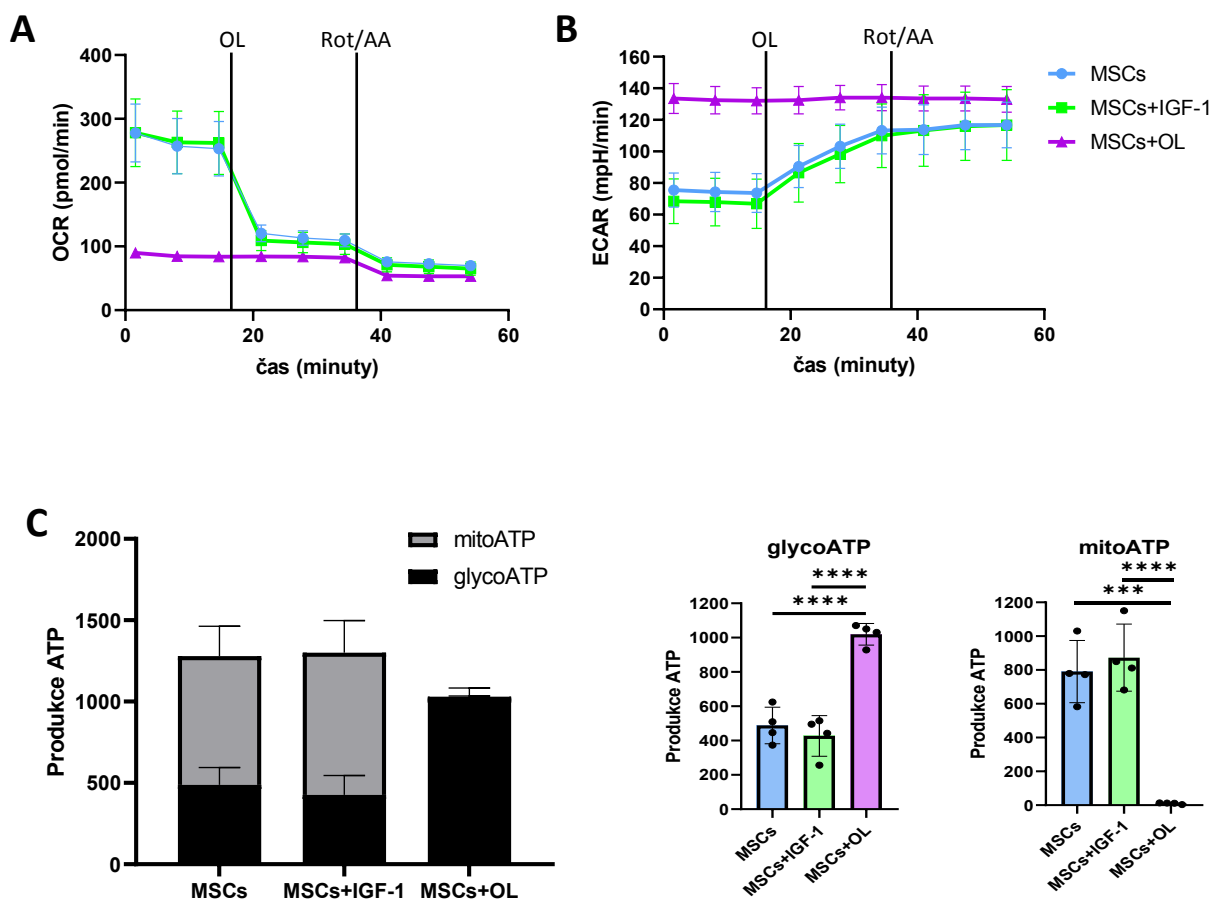
Obrázek 18: Vliv stimulace MSCs na expresi genů asociovaných s mitochondriální dynamikou (A), autofagií a mitofagií (B). Relativní exprese genů byla stanovena pomocí qPCR. Jako kontrola byla použita exprese genů *ACTB* a *GAPDH*. Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ představují statisticky významnou odchylku. Zkratky: IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin

5.2.4 Metabolismus MSCs

O oligomycinu je známo, že v buňkách inhibuje oxidativní fosforylaci a podporuje glykolytický metabolismus. Abychom to potvrdili, měřili jsme u MSCs stimulovaných po dobu 48 hodin expresi genů kódujících vybrané glykolytické enzymy. Nárůst exprese glykolytických genů po stimulaci oligomycinem jsme ale nepozorovali (obrázek 19), což mohlo být způsobeno špatným načasováním měření. Rozhodli jsme se proto detekovat metabolismus MSCs s využitím Seahorse analyzáru. Po stimulaci MSCs oligomycinem jsme pozorovali sníženou spotřebu kyslíku (obrázek 20 – A) a naopak zvýšenou míru okyselení extracelulárního prostředí (obrázek 20 – B). Detekce produkce ATP ukázala signifikantní nárůst ATP vyprodukovaného glykolýzou u MSCs ovlivněných oligomycinem. Oproti tomu množství ATP syntetizovaného v mitochondriích bylo u těchto buněk téměř nulové (obrázek 20 – C). Na základě těchto výsledků jsme potvrdili inhibici oxidativní fosforylace a nárůst glykolýzy u MSCs stimulovaných oligomycinem. Porovnání metabolismu MSCs nestimulovaných a MSCs ovlivněných IGF-1 neukázalo žádný výrazný rozdíl (obrázek 20).



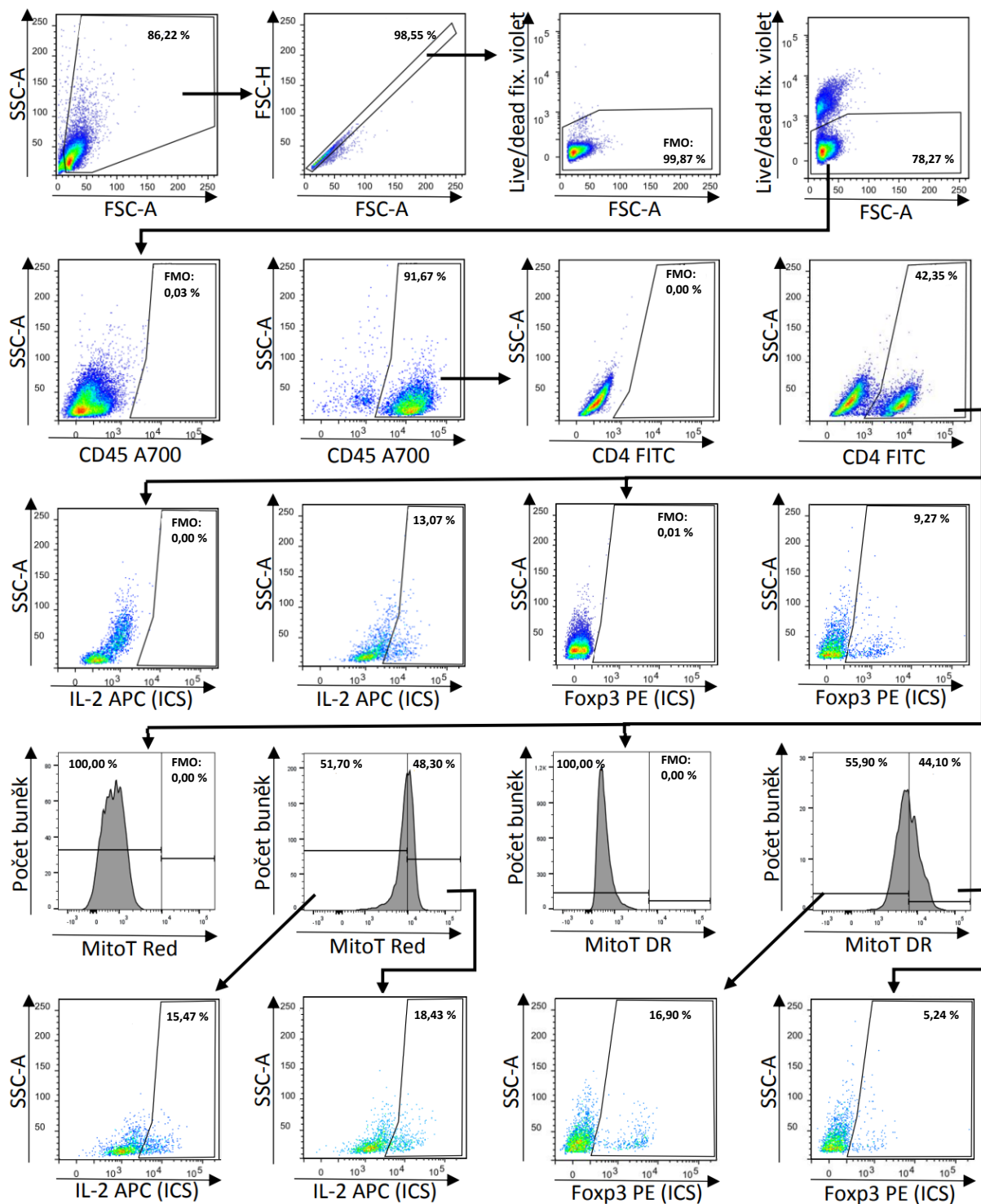
Obrázek 19: Vliv stimulace MSCs na expresi genů asociovaných s glykolýzou. Relativní exprese genů byla stanovena pomocí qPCR. Jako kontrola byla použita exprese genů *ACTB* a *GAPDH*. Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Zkratky: IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin



Obrázek 20: Vliv stimulace na energetický metabolismus MSCs. Měřeno na Seahorse analyzáru. Výsledky ze 4 nezávislých experimentů. A – graf ukazující spotřebu kyslíku buňkami, B – graf ukazující míru okyselení extracelulárního prostředí, C – grafy ukazující míru produkce ATP. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ představují statisticky významnou odchylku. Zkratky: IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin, Rot – rotenon, AA – antimycin A, OCR – oxygen consumption rate, ECAR – extracellular acidification rate, glycoATP – ATP vyprodukovaný glykolýzou, mitoATP – ATP vyprodukovaný oxidativní fosforylací

5.2.5 Analýza fenotypu splenocytů po kokultivaci s MSCs

Imunomodulační působení MSCs bylo u nás v laboratoři již několikrát potvrzeno. Zde nás zajímalo, jaký vliv má 48hodinová stimulace MSCs IGF-1, nebo oligomycinem a jí indukovaný nárůst mitochondriálního přenosu na fenotyp splenocytů. Konkrétně jsme se zaměřili na T-lymfocyty, jelikož změny navozené MSCs jsou u nich dobře popsány, a můžeme tak sledovat vliv jednotlivých ovlivnění MSCs. Analýza buněk byla provedena s využitím průtokové cytometrie. Gatovací strategie je ukázána na obrázku 21.



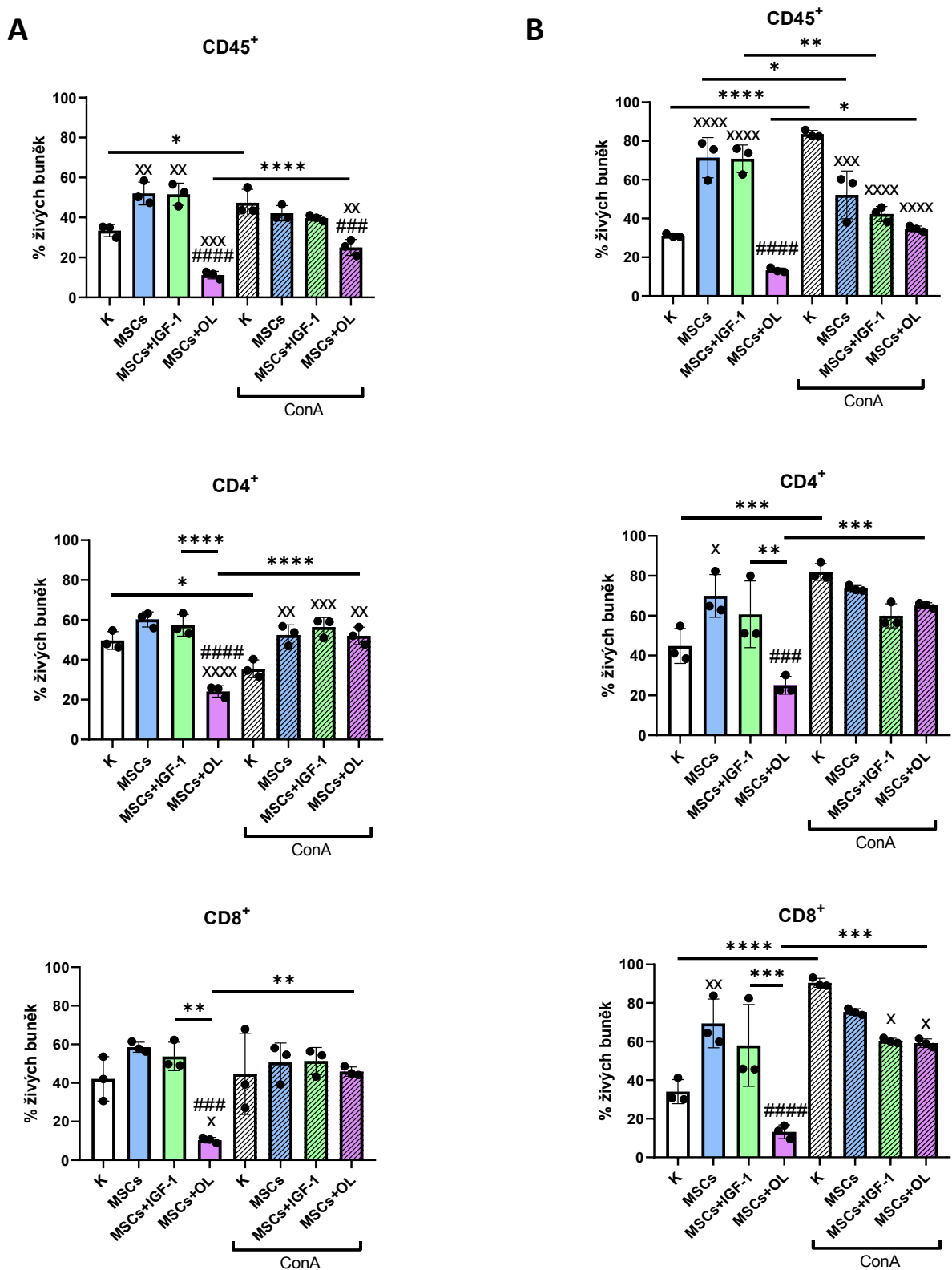
Obrázek 21: Ukázka gatovací strategie použité při analýze intracelulárních markerů splenocytů. Ukázáno na cytokinu IL-2 a transkripčním faktoru Foxp3 u CD4⁺ T-lymfocytů, ostatní cytokiny a transkripční faktory byly gatovány podobně. Analýza intracelulárních markerů byla nejprve provedena ze všech CD4⁺ buněk. Následně byly buňky rozděleny na MitoT^{low} a MitoT^{high} (gatováno na základě průměru histogramu) pro analýzu intracelulárních cytokinů a exprese transkripčních faktorů v závislosti na přenosu mitochondrií. Zkratky: ICS – intracelulární barvení, MitoT Red – MitoTracker Red CMXRos, MitoT DR – MitoTracker Deep Red

5.2.5.1 Přežívání splenocytů

Nejprve jsme se podívali na míru přežívání splenocytů ($CD45^+$ buňky) a $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů po 48hodinové a 72hodinové kokultivaci s MSCs v přítomnosti, nebo nepřítomnosti konkanavalinu A. Mrtvé buňky byly detekovány s využitím Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit.

Bez stimulace konkanavalinem A výsledky ukazují signifikantní nárůst procenta živých $CD45^+$ buněk po 48hodinové i 72hodinové kokultivaci s nestimulovanými MSCs a MSCs stimulovanými IGF-1. U $CD4^+$ a $CD8^+$ buněk bylo také pozorováno zvýšení procenta živých buněk, signifikantní nárůst byl ale detekován pouze po 72hodinové kokultivaci s nestimulovanými MSCs. Kokultivace splenocytů s MSCs ovlivněnými oligomycinem naopak vede k výraznému snížení přežívání u všech detekovaných typů buněk.

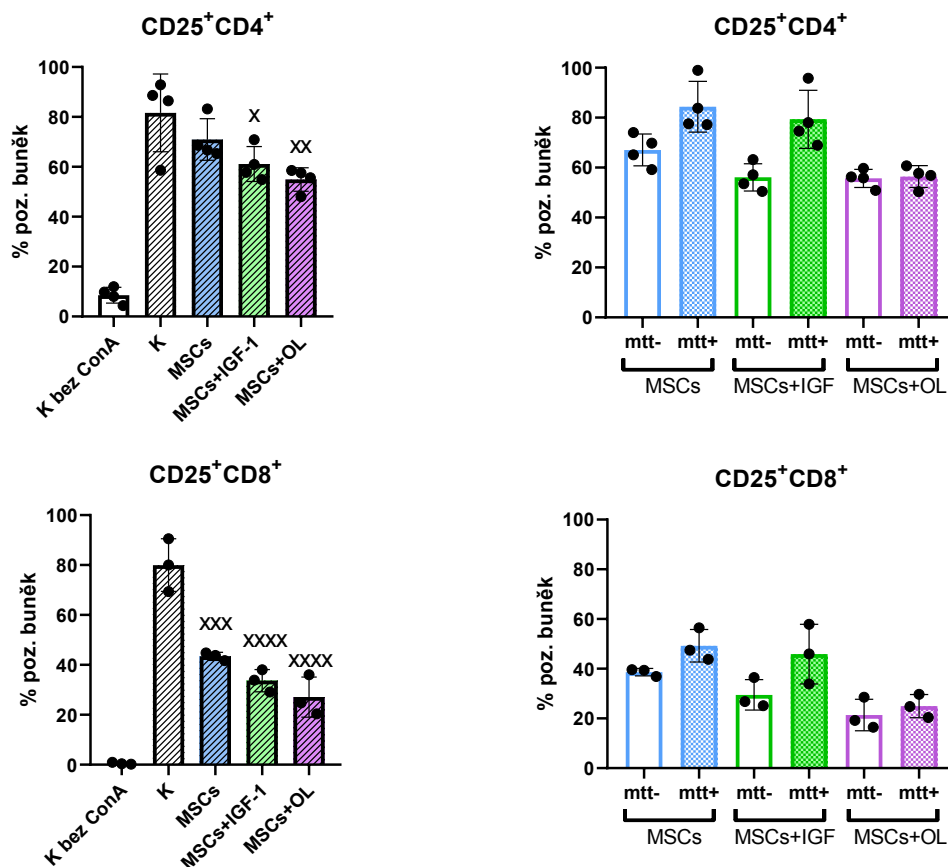
Oproti nestimulovaným splenocytům se v přítomnosti konkanavalinu A signifikantně zvyšuje procento živých $CD45^+$, $CD4^+$ i $CD8^+$ buněk kultivovaných samostatně nebo s MSCs ovlivněnými oligomycinem. Aktivované $CD4^+$ buňky kultivované 48 hodin s MSCs bez ohledu na ovlivnění vykazují vyšší přežívání v porovnání s těmi, které byly kultivovány samostatně. U aktivovaných $CD8^+$ buněk nebyl v procentu živých buněk po 48hodinové kultivaci detekován rozdíl. Po 72 hodinách byla naopak pozorována klesající tendence přežívání $CD45^+$, $CD4^+$ i $CD8^+$ buněk kultivovaných v přítomnosti konkanavalinu A a MSCs oproti buňkám kultivovaným bez MSCs. Signifikantní pokles procenta živých buněk byl detekován u $CD45^+$ buněk po kokultivaci se všemi měřenými skupinami MSCs, u $CD8^+$ byl signifikantní rozdíl pouze po kokultivaci s MSCs stimulovanými (obrázek 22).



Obrázek 22: Vliv stimulovaných a nestimulovaných MSCs na přežívání CD45⁺, CD4⁺ a CD8⁺ buněk. A – kokultivace MSCs a splenocytů 48 hodin, B – 72 hodin. Měřeno průtokovou cytometrií. Grafy ukazují procentuální zastoupení živých buněk. Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, */x p≤0,05, **/xx p≤0,01, ***/xxx/#### p≤0,001, ****/xxxx/##### p≤0,0001 představují statisticky významnou odchylku (# porovnání vůči MSCs dané skupiny, x porovnání vůči K dané skupiny). Zkratky: K – splenocyty kultivované bez přítomnosti MSCs, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin, ConA – konkanavalin A

5.2.5.2 Aktivace T-lymfocytů

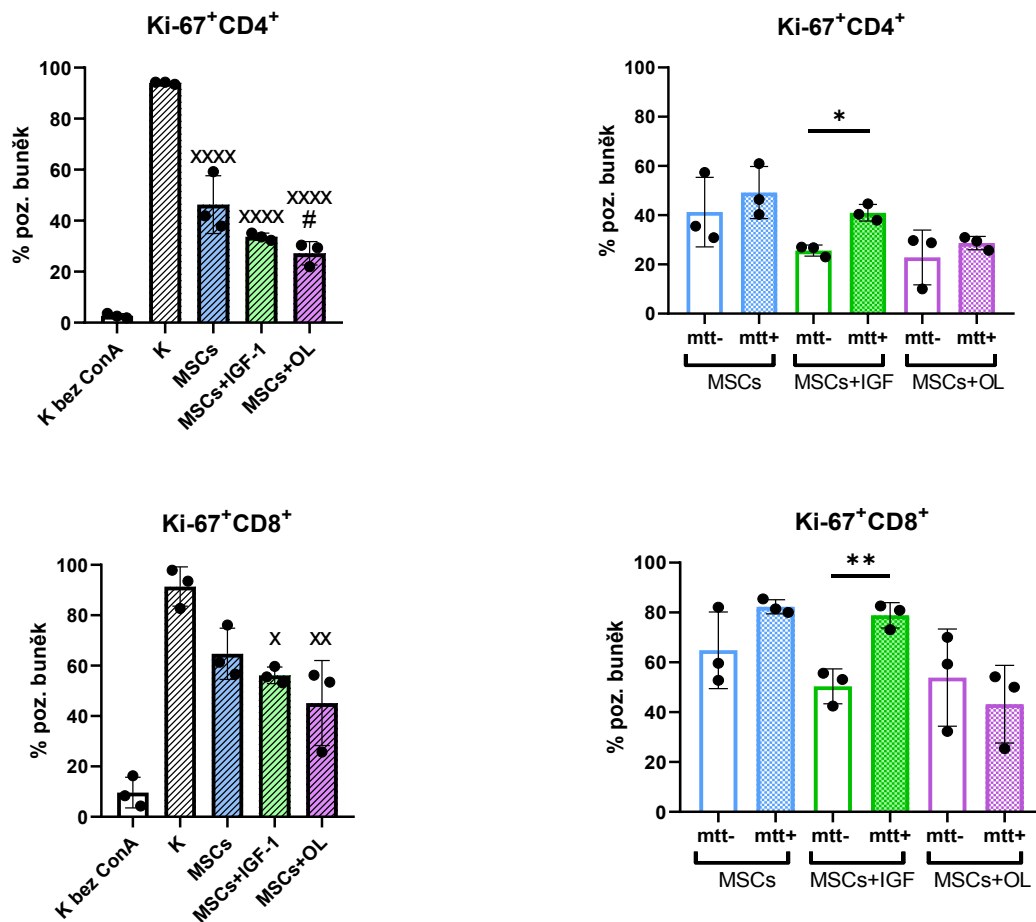
Splenocyty byly kokultivovány s MSCs v přítomnosti konkanavalinu A po dobu 48 hodin. Aktivace CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů byla určena na základě exprese povrchové molekuly CD25. Expresi CD25 na povrchu CD4⁺ i CD8⁺ buněk klesá po kokultivaci splenocytů s MSCs, přičemž stimulované MSCs potlačují expresi více než MSCs nestimulované. Dále nás zajímalo, jestli mitochondriální přenos z MSCs probíhá preferenčně do aktivovaných T-lymfocytů, nebo ne. T-lymfocyty jsme proto rozdělili na dvě skupiny – ty, které mitochondrie od MSCs nedostaly nebo jich dostaly málo (mtt-), a ty, které mitochondrií dostaly více (mtt+) (obrázek 21). Analýza v závislosti na mitochondriálním přenosu ukázala, že mitochondrie od nestimulovaných MSCs a MSCs ovlivněných IGF-1 přijímají více T-lymfocyty, které na svém povrchu exprimují CD25. Avšak pozorovaný rozdíl není signifikantní (obrázek 23).



Obrázek 23: Vliv stimulovaných a nestimulovaných MSCs na aktivaci T-lymfocytů. Měřeno průtokovou cytometrií. Grafy ukazují procentuální zastoupení CD25⁺ T-lymfocytů. Výsledky ze 3 až 4 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, párový t-test byl použit pro porovnání mtt- a mtt+, x p ≤ 0,05, xx p ≤ 0,01, xxx p ≤ 0,001, xxxx p ≤ 0,0001 představují statisticky významnou odchylku vůči K. Zkratky: K – splenocyty kultivované bez přítomnosti MSCs, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin, ConA – konkanavalin A, mtt- – buňky, které mitochondrie od MSCs nepřijaly nebo jich přijaly málo, mtt+ – buňky, jež dostaly více mitochondrií od MSCs

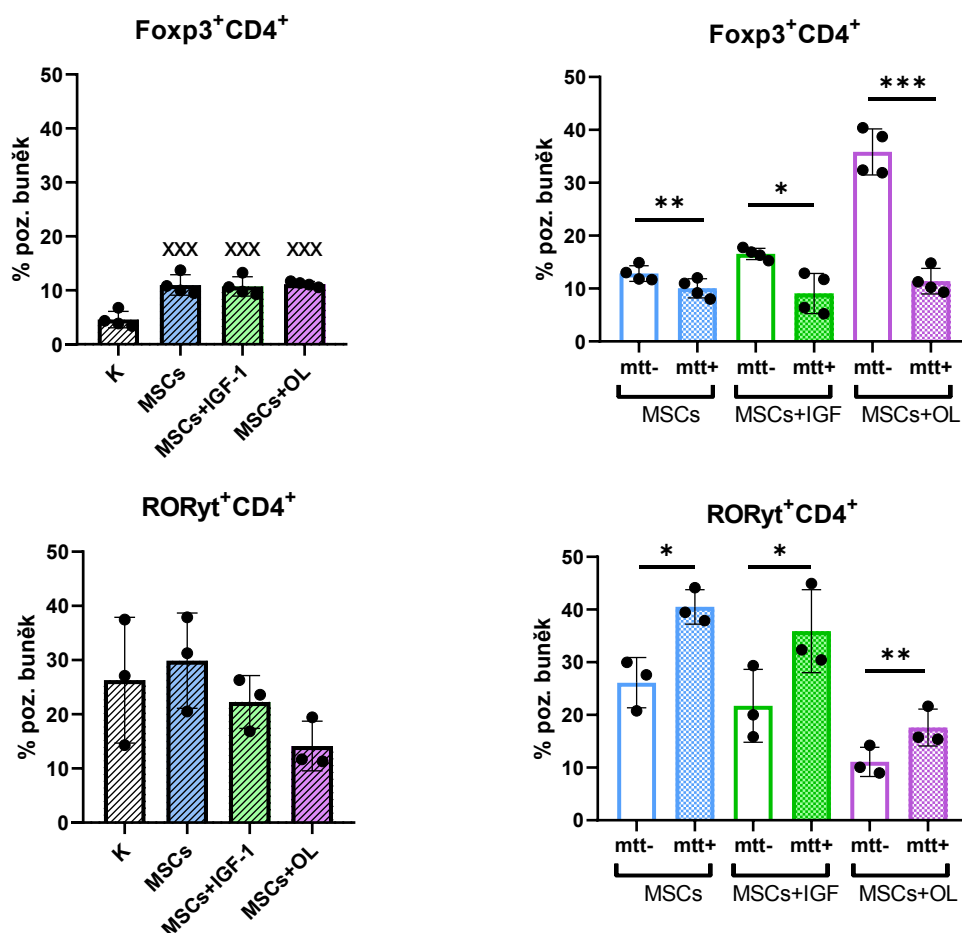
5.2.5.3 Expres transkripčních faktorů u T-lymfocytů

Vybrané transkripční faktory byly detekovány po 72hodinové kokultivaci splenocytů a MSCs v přítomnosti konkanavalinu A. Nejprve jsme stanovili expresi Ki-67, markeru proliferace. Ze získaných výsledků vyplývá, že proliferace CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocytů je po kokultivaci s MSCs potlačena. Po kokultivaci splenocytů se stimulovanými MSCs je pokles větší. S výjimkou T-lymfocytů kokultivovaných s MSCs stimulovanými oligomycinem přijímají více mitochondrií od MSCs Ki-67⁺ T-lymfocyty. U CD4⁺ i CD8⁺ buněk po kokultivaci s MSCs stimulovanými IGF-1 je tento rozdíl signifikantní (obrázek 24).



Obrázek 24: Vliv stimulovaných a nestimulovaných MSCs na expresi transkripčního faktoru Ki-67 u T-lymfocytů. Měřeno průtokovou cytometrií. Grafy ukazují procentuální zastoupení Ki-67⁺ T-lymfocytů. Výsledky ze 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, párový t-test byl použit pro porovnání mtt- a mtt+, */#/x p≤0,05, **/xx p≤0,01, xxx p≤0,0001 představují statisticky významnou odchylku (# porovnání vůči MSCs, x porovnání vůči K). Zkratky: K – splenocyty kultivované bez přítomnosti MSCs, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin, ConA – konkanavalin A, mtt- – buňky, které mitochondrie od MSCs nepřijaly nebo jich přijaly málo, mtt+ – buňky, jež dostaly více mitochondrií od MSCs

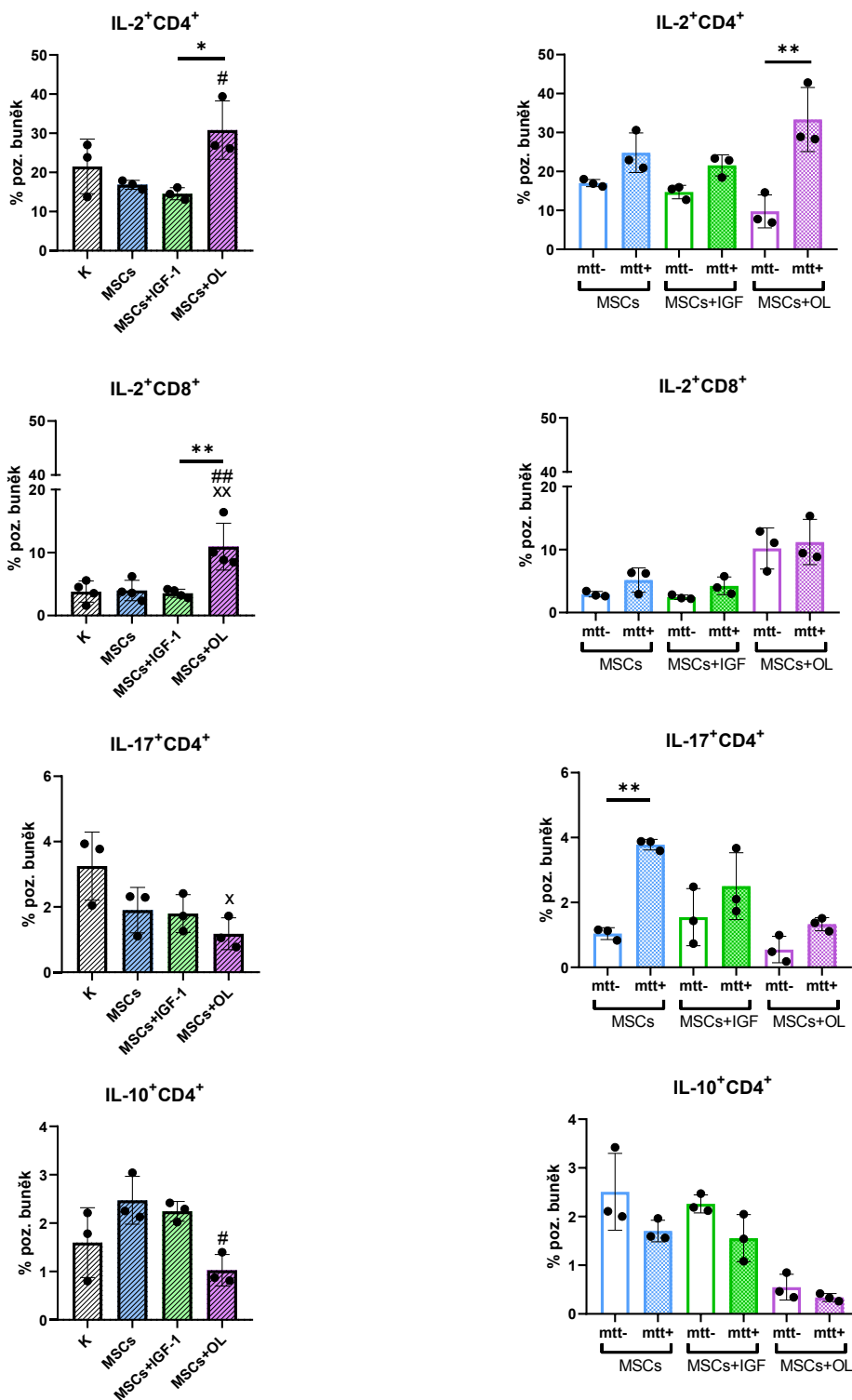
Dále byla u CD4⁺ buněk měřena exprese Foxp3, transkripčního faktoru typického pro Treg, která se po kokultivaci s nestimulovanými i stimulovanými MSCs signifikantně zvyšuje. Signifikantní rozdíly byly pozorovány také při analýze exprese Foxp3 v závislosti na mitochondriálním přenosu. U všech měřených skupin byl u Foxp3⁺CD4⁺ T-lymfocytů detekován nižší příjem mitochondrií od MSCs. Expres transkripčního faktoru RORγt, který je asociován především s Th17 lymfocyty, se po kokultivaci CD4⁺ buněk s nestimulovanými MSCs a MSCs ovlivněnými IGF-1 výrazně nemění. Malý, ale nesignifikantní pokles exprese RORγt byl pozorován po kokultivaci s MSCs ovlivněnými oligomycinem. Analýza v závislosti na mitochondriálním přenosu ukázala, že více mitochondrií od MSCs přijímají CD4⁺ buňky exprimující RORγt. Pozorovaný rozdíl je signifikantní u všech měřených skupin (obrázek 25).



Obrázek 25: Vliv stimulovaných a nestimulovaných MSCs na expresi transkripčních faktorů Foxp3 a RORγt u T-lymfocytů. Měřeno průtokovou cytometrií. Grafy ukazují procentuální zastoupení Foxp3⁺, nebo RORγt⁺ T-lymfocytů. Výsledky ze 3 až 4 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, párový t-test byl použit pro porovnání mtt- a mtt+, * p≤0,05, ** p≤0,01, ***/xxx p≤0,001 představují statisticky významnou odchylku (x porovnání vůči K). Zkratky: K – splenocyty kultivované bez přítomnosti MSCs, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin, ConA – konkanavalin A, mtt- – buňky, které mitochondrie od MSCs nepřijaly nebo jich přijaly málo, mtt+ – buňky, jež dostaly více mitochondrií od MSCs

5.2.5.4 Stanovení intracelulárních cytokinů u T-lymfocytů

Stanovení intracelulárních cytokinů IL-2, IL-17 a IL-10 byla provedena u splenocytů kokultivovaných 48 hodin s MSCs v přítomnosti konkanavalinu A. Výsledky neukazují významnou změnu produkce IL-2 u CD4⁺ a CD8⁺ buněk po kokultivaci s nestimulovanými MSCs a MSCs ovlivněnými IGF-1 oproti samostatně kultivovaným splenocytům. Avšak byl pozorován signifikantní nárůst CD4⁺ i CD8⁺ buněk produkujících IL-2 po kokultivaci s MSCs stimulovanými oligomycinem. Zároveň jsme prokázali, že signifikantně více mitochondrií od MSCs ovlivněných oligomycinem přijímají CD4⁺ buňky produkující IL-2. U ostatních měřených skupin je pozorovaný trend stejný, ale rozdíl není signifikantní. Procento IL-17⁺CD4⁺ buněk po kokultivaci s nestimulovanými i stimulovanými MSCs klesá, signifikantní pokles byl pozorován u skupiny s oligomycinem. Analýza v závislosti na mitochondriálním přenosu ukázala stejný trend jako v případě IL-2. CD4⁺ buňky obsahující intracelulární IL-17 přijímají od MSCs více mitochondrií, signifikantní rozdíl byl pozorován u CD4⁺ buněk kokultivovaných s nestimulovanými MSCs. U produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 CD4⁺ buňkami po kokultivaci s nestimulovanými MSCs a MSCs stimulovanými IGF-1 byl pozorován rostoucí trend, avšak rozdíl není signifikantní. Naopak MSCs ovlivněné oligomycinem IL-10 potlačují, signifikantně ve srovnání s nestimulovanými MSCs. Oproti ostatním měřeným cytokinům, přenos mitochondrií z MSCs probíhá spíše do CD4⁺ buněk, které IL-10 neprodukují. U žádné z měřených skupin ale rozdíl není signifikantní (obrázek 26).



Obrázek 26: Vliv stimulovaných a nestimulovaných MSCs na produkci cytokinů. Měřeno průtokovou cytometrií. Grafy ukazují procentuální zastoupení T-lymfocytů obsahujících intracelulární IL-2, IL-17, nebo IL-10. Výsledky ze 3 až 4 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byla použita jednosměrná ANOVA – Tukeyho test, párový t-test byl použit pro porovnání mtt- a mtt+, */#/x p≤0,05, **/##/xx p≤0,01 představují statisticky významnou odchylku (# porovnání vůči MSCs, x porovnání vůči K). Zkratky: K – splenocyty kultivované bez přítomnosti MSCs, IGF-1 – růstový faktor podobný inzulinu 1, OL – oligomycin, mtt- – buňky, které mitochondrie od MSCs nepřijaly nebo jich přijaly málo, mtt+ – buňky, jež dostaly více mitochondrií od MSCs

6 Diskuze

MSCs mají imunomodulační účinky. Jedním z mechanismů, který k imunomodulaci využívají je mitochondriální přenos (Court et al., 2020; Luz-Crawford et al., 2019; Yuan et al., 2021). Přijetí mitochondrií od MSCs indukuje v recipientních buňkách metabolické změny. Dochází ke zvýšení oxidativní fosforylace, která je u imunitních buněk spojována s protizánětlivým fenotypem (Jackson et al., 2016; Luz-Crawford et al., 2019). Schopnost MSCs přenášet mitochondrie do imunitních buněk byla potvrzena také u nás v laboratoři (Porubská et al., 2021). Cílem tohoto projektu bylo zjistit, zda je možné stimulací MSCs vybranými faktory mitochondriální přenos modulovat.

V první části tohoto projektu jsme se věnovali vlivu rapamycinu, IGF-1 a IFN γ na MSCs a jimi zprostředkovaný přenos mitochondrií do imunitních buněk. Dle Dominiciho a kolegů, kteří vydali minimální kritéria pro definování MSCs, jsou MSCs charakterizovány expresí povrchových molekul CD73, CD90 a CD105. Naopak by neměly exprimovat molekuly CD34, CD45 a CD11b, jejichž exprese je typická pro hematopoetické buňky (Dominici et al., 2006). Analýza exprese povrchových molekul průtokovou cytometrií (obrázek 6) ukázala, že námi používané MSCs toto kritérium splňují. Zároveň z výsledků vyplývá, že se fenotyp MSCs po stimulaci výše zmíněnými faktory nemění.

Rapamycin, inhibitor kinázy mTOR, aktivuje v buňkách autofagii, což je proces, při kterém dochází k lyzozomální degradaci intracelulárních proteinů či organel (Pan et al., 2009). Indukce autofagie v MSCs podporuje jejich přežívání v ischemickém prostředí (Li et al., 2020), má také pozitivní vliv na regenerační a imunomodulační funkce MSCs (Kim et al., 2015; Li et al., 2020). Doposud však nebyl popsán vliv rapamycinu a jím indukované autofagie na přenos mitochondrií z MSCs. Naši práci jsme prokázali, že po stimulaci MSCs rapamycinem dochází ke zvýšení mitofagie (obrázek 10), procesu selektivní degradace mitochondrií v lysozomech (Lemasters, 2005). Zároveň jsme detekovali snížení aktivity enzymu Krebsova cyklu sukcinát dehydrogenázy lokalizovaného v mitochondriích (obrázek 13). To by mohlo souviset se sníženou proliferací MSCs po stimulaci rapamycinem. Rozdíl v počtu buněk mezi jednotlivými skupinami jsme však po 48hodinové kultivaci nepozorovali (data nejsou ukázána). Usuzujeme tudíž, že snížená aktivita sukcinát dehydrogenázy je spojena se zvýšenou degradací mitochondrií. Předpokládali jsme snížení počtu mitochondrií v MSCs po stimulaci rapamycinem a z toho důvodu snížený mitochondriální přenos. Získané výsledky však ukázaly, že ke změně v mitochondriálním přenosu po stimulaci MSCs rapamycinem nedochází

(obrázek 8). Nebyl pozorován ani pokles mitochondriální masy nebo mitochondriálního membránového potenciálu (obrázek 11). To si vysvětlujeme tím, že mitofagie probíhá pouze v 7 % MSCs, což pravděpodobně není dostatečný počet proto, abychom detekovali výrazné změny v množství mitochondrií. Koncentrace rapamycinu byla zvolena na základě zkušenosti z laboratoře. Případné použití vyšší koncentrace by mohlo vést k odlišným výsledkům.

Stimulace MSCs prozánětlivými cytokiny podporuje jejich imunomodulační působení. Nejběžněji používaným cytokinem je IFN γ (Javorkova et al., 2014; Kim et al., 2018; Liu et al., 2019; Polchert et al., 2008). Z toho důvodu jsme si ho vybrali jako jedno z ovlivnění pro naše experimenty. Je známo, že MSCs ovlivněné IFN γ zvyšují produkci protizánětlivých faktorů, jako jsou například prostaglandin E2 čiIDO (Liu et al., 2019). Dalším příkladem imunosupresivní molekuly produkované MSCs je NO (Ren et al., 2008). Jeho produkci jsme se rozhodli detekovat, abychom potvrdili aktivaci imunomodulačního působení MSCs po stimulaci IFN γ . Výsledky ukázaly nárůst produkce NO u MSCs stimulovaných IFN γ (obrázek 15 – C, D), což je v souladu se studií Rena a kolegů, kteří prokázali nárůst exprese indukovatelné NO syntázy a následně zvýšenou produkci NO po stimulaci MSCs prozánětlivými cytokiny (Ren et al., 2008). Nárůst exprese indukovatelné NO syntázy v MSCs stimulovaných IFN γ byl popsán také u nás v laboratoři (Javorkova et al., 2014). Liu a kolegové ve své studii popisují, že ovlivnění MSCs IFN γ indukuje metabolické změny, konkrétně přechod MSCs na glykolýzu (Liu et al., 2019). Analýza exprese genů *H6PD*, *HK1* a *PFKFB1*, které kódují enzymy glykolýzy, ale neukázala žádnou změnu (obrázek 14), nárůst glykolýzy u MSCs stimulovaných IFN γ jsme tudíž nepotvrdili. V souladu s našimi výsledky je práce Wobmaové a kolegů, kteří též zvýšení glykolýzy u MSCs ovlivněných IFN γ nepozorovali (Wobma et al., 2018). Přímý vliv IFN γ na mitochondrie nebyl popsán. V této práci jsme nedetekovali žádné změny v uspořádání a dynamice mitochondrií (obrázky 9, 12), ani žádné změny v mitochondriální masě a mitochondriálním membránovém potenciálu (obrázek 11) po stimulaci MSCs IFN γ . Luz-Crawfordová a kolegové ve své studii ukazují, že MSCs ovlivněné IFN γ a TNF α vykazují stejný mitochondriální přenos do T-lymfocytů jako nestimulované MSCs (Luz-Crawford et al., 2019). Stejně výsledky jsme pozorovali u MSCs stimulovaných samotným IFN γ (obrázek 8).

Růstový faktor IGF-1 podporuje v buňkách mitochondriální biogenezi. Zároveň bylo popsáno, že stimulace buněk IGF-1 vede k indukci mitofagie jakožto protektivního mechanismu, který zabraňuje hromadění poškozených mitochondrií v buňce (Lyons et al., 2017). Tyto účinky IGF-1 byly potvrzeny například u myoblastů či různých typů nádorových

buněk (Guan et al., 2022; Lyons et al., 2017; Riis et al., 2020). Co se MSCs týče, studována je především role IGF-1 při diferenciaci (Crane et al., 2013; Longobardi et al., 2006). Vliv IGF-1 na mitochondrie a mitochondriální přenos nebyl doposud popsán. V této práci jsme ukázali, že stimulace MSCs IGF-1 zvyšuje jejich schopnost předávat mitochondrie CD4⁺, CD8⁺ a CD19⁺ buňkám (obrázky 8, 16). Předpokládali jsme, že k nárůstu mitochondriálního přenosu dochází z důvodu zvýšeného počtu mitochondrií v MSCs stimulovaných IGF-1. Tuto hypotézu jsme však nepotvrdili. Nedetkovali jsme nárůst mitochondriální masy ani mitochondriálního membránového potenciálu u MSCs ovlivněných IGF-1 (obrázek 11). Exprese genu *PPARG*, který je asociován s biogenezí mitochondrií, se po stimulaci MSCs IGF-1 také nezměnila (obrázky 12, 18 – A). Na základě těchto výsledků jsme došli k závěru, že k aktivaci mitochondriální biogeneze po stimulaci MSCs IGF-1 v našem nastavení nedochází. Nedetkovali jsme ani nárůst mitofagie u MSCs ovlivněných IGF-1 (obrázky 10, 18 – B). 48hodinová stimulace MSCs IGF-1 vedla k poklesu exprese s autofagií asociovaného genu *MAP1LC3B*, což poukazuje na potlačení autofagie (obrázek 18 – B). To je v souladu s výsledky Troncosa a kolegů, kteří ve své studii popisují, že IGF-1 snižuje autofagii v kardiomyocytech prostřednictvím aktivace signální dráhy Akt/mTOR (Troncoso et al., 2012). Později to bylo potvrzeno také například na buňkách kolorektálního karcinomu (Wang & Gu, 2018). Mikroskopie MSCs s fluorescenčně značenými mitochondriemi ukázala odlišné uspořádání mitochondrií u MSCs stimulovaných IGF-1 ve srovnání s MSCs nestimulovanými. Nestimulované MSCs měly mitochondrie uspořádány kolem jádra, zatímco mitochondrie MSCs ovlivněných IGF-1 byly rozmístěné po celé buňce (obrázky 9 – C, 17 – B). Stejnou změnu v uspořádání mitochondrií po stimulaci IGF-1 pozorovali Lyonsová a kolegové v buňkách MCF-7, buněčné linii odvozené od karcinomu prsu (Lyons et al., 2017). Myslíme si, že umístění mitochondrií v buňce blíže k cytoplazmatické membráně by mohlo vést k podpoření mitochondriálního přenosu. Je ale zapotřebí dalších experimentů, které by to potvrdily. Jelikož jsou mitochondrie dynamické organely, jejichž struktura se v závislosti na stavu a potřebách buňky mění, rozhodli jsme se detekovat expresi genů *MFN1*, *MFN2*, *OPA1* a *DRP1* asociovaných s mitochondriální dynamikou. Proteiny Mfn1, Mfn2 a Opa1 se uplatňují v procesu mitochondriální fúze (Song et al., 2009), zatímco Drp1 se podílí na dělení mitochondrií (Basu et al., 2017). Co se spojitosti mezi mitochondriální dynamikou a mitochondriálním transferem týče, předpokládáme, že jsou spíše přenášeny mitochondrie oddělené než dlouhá mitochondriální síť. Námi získané výsledky však neukázaly výrazné změny v expresi výše zmíněných genů po stimulaci MSCs IGF-1 (obrázky 12, 18 – A). Detkovali jsme také produkci ROS. ROS vznikají převážně v mitochondriích jako vedlejší

produkt oxidativní fosforylace (Quinlan et al., 2013). Avšak jejich zvýšená produkce, jež je často spojena s mitochondriální dysfunkcí, vede k oxidativnímu poškození a jím indukované senescenci či apoptóze buňky (Ye et al., 2020). Sagar a kolegové ve své studii ukázali, že MSCs s nefunkčními mitochondriemi mají sníženou schopnost mitochondriálního přenosu (Sagar et al., 2023). Přidání antioxidantů k MSCs naopak podporuje tvorbu TNT a přenos mitochondrií (Li et al., 2017). Tudíž nás napadlo, že by zvýšený mitochondriální přenos z MSCs ovlivněných IGF-1 mohl být spojen se sníženým množstvím intracelulárních ROS. To se nám ale nepotvrdilo. Výsledky ukázaly, že IGF-1 neovlivňuje produkci ROS v MSCs (obrázek 15 – A, B). U MSCs jsme detekovali mitochondriální biogenezi, mitofagii, dynamiku mitochondrií a jejich uspořádání, tvorbu ROS a metabolickou aktivitu, avšak mechanismus, který stojí za zvýšenou schopností MSCs stimulovaných IGF-1 přenášet mitochondrie do imunitních buněk, se nám v této práci zjistit nepodařilo.

V druhé části tohoto projektu jsme se věnovali především vlivu oligomycinu na MSCs a jimi zprostředkovaný mitochondriální přenos. Oligomycin inhibuje v buňkách mitochondriální ATP syntázu, a blokuje tak oxidativní fosforylaci (Symersky et al., 2012). Contreras-Lopez a kolegové ve své práci ukázali, že stimulace MSCs oligomycinem indukuje přeprogramování těchto buněk na glykolýzu a že zvýšení glykolýzy podporuje imunomodulační působení MSCs (Contreras-Lopez et al., 2020). Abychom potvrdili metabolické změny indukované oligomycinem, detekovali jsme metabolickou aktivitu buněk s využitím Seahorse analyzáru. Získané výsledky ukázaly, že MSCs ovlivněné oligomycinem mají sníženou spotřebu kyslíku a neprodukují téměř žádné ATP oxidativní fosforylací. Oproti tomu jejich glykolytický metabolismus je zvýšený ve srovnání s nestimulovanými MSCs (obrázek 20). V rozporu s tím jsou výsledky z qPCR, které neprokázaly nárůst exprese genů kódujících enzymy glykolýzy (obrázek 19). Příčinou je pravděpodobně špatně zvolená doba měření genové exprese. Myslíme si, že k nárůstu exprese glykolytických genů došlo kratší dobu po stimulaci a po 48 hodinách již nebylo zvýšení exprese detekovatelné. Dále nás zajímalo, zda má stimulace oligomycinem vliv na přenos mitochondrií z MSCs. Studie ukazují, že přenos mitochondrií z MSCs s dysfunkčními mitochondriemi je potlačen (Jiang et al., 2016; Sagar et al., 2023). Předpokládali jsme proto snížení mitochondriálního přenosu po stimulaci MSCs oligomycinem. Výsledky však ukázaly pravý opak. Po stimulaci MSCs oligomycinem jsme pozorovali výrazný nárůst přenosu mitochondrií do T-lymfocytů. Téměř všechny CD4⁺ a CD8⁺ buňky kokultivované s MSCs ovlivněnými oligomycinem přijaly od MSCs mitochondrie (obrázek 16). Navíc jsme těmito výsledky ukázali, že mitochondriální přenos do T-lymfocytů

aktivovaných konkanavalinem A je vyšší než do T-lymfocytů neaktivovaných. Analýza genové exprese MSCs neukázala zvýšení exprese genů *PINK1* a *TIMM23* asociovaných s mitofagií po stimulaci MSCs oligomycinem (obrázek 18 – B). Mitofagie tudíž u těchto buněk není hlavní proces využívaný k odstranění mitochondrií s narušenou funkcí. Na základě námi získaných výsledků usuzujeme, že MSCs ovlivněné oligomycinem uvolňují poškozené mitochondrie z buňky, čímž si zajišťují vlastní přežití. Uvolněné mitochondrie jsou následně internalizovány okolními buňkami, v našem případě T-lymfocyty. To by bylo možné prokázat izolací EV ze supernatantu různě ovlivněných MSCs a kultivací T-lymfocytů v přítomnosti izolovaných EV. Naše vysvětlení je v souladu s prací Phinneyho a kolegů, kteří ukázali, že MSCs vystavené oxidačnímu stresu uvolňují EV obsahující depolarizované mitochondrie. EV jsou následně pohlceny makrofágy a mitochondrie jsou integrovány do jejich mitochondriální sítě (Phinney et al., 2015). Snížení aktivity oxidativní fosforylace či poškození mitochondrií je spojováno s fragmentací mitochondrií (Das et al., 2020; Forni et al., 2016; Wu et al., 2011). Naši práci jsme prokázali, že poškození mitochondriální funkce MSCs oligomycinem vede k výraznému oddělení mitochondrií. Fragmentace mitochondrií byla detekována s využitím fluorescenční mikroskopie (obrázek 17 – C) a následně potvrzena na základě zvýšené exprese genu *DRP1*. Analýza genové exprese zároveň ukázala nárůst exprese genu *PPARG* v MSCs po stimulaci oligomycinem (obrázek 18 – A). To poukazuje na zvýšení mitochondriální biogeneze jakožto záchranného mechanismu, jehož cílem je vykompenzovat ztrátu funkčních mitochondrií, a udržet tak buněčnou homeostázu (Das et al., 2020).

Mitochondriální přenos je jeden z mechanismů, které MSCs využívají k modulaci imunitního systému (Do et al., 2021; Luz-Crawford et al., 2019; Morrison et al., 2017). V této práci jsme prokázali, že IGF-1 a oligomycin podporují přenos mitochondrií z MSCs do imunitních buněk. Následně jsme chtěli zjistit, zda stimulace MSCs těmito faktory ovlivňuje také jejich imunomodulační potenciál. Nejprve jsme detekovali přežívání splenocytů kultivovaných s MSCs, jelikož bylo popsáno, že MSCs podporují přežívání imunitních buněk (Benvenuto et al., 2007; Pedrazza et al., 2014; Porubska et al., 2021). Výsledky ukázaly zvýšené přežívání $CD45^+$ buněk kokultivovaných s nestimulovanými MSCs a MSCs stimulovanými IGF-1, oproti tomu MSCs ovlivněné oligomycinem měly na přežívání stimulovaných i nestimulovaných splenocytů negativní efekt. Jelikož jsme se rozhodli v této práci dále věnovat pouze T-lymfocytům, detekovali jsme také míru přežívání $CD4^+$ a $CD8^+$ buněk. I zde jsme prokázali pozitivní efekt nestimulovaných MSCs a MSCs stimulovaných IGF-1 na přežívání T-lymfocytů. Po kokultivaci T-lymfocytů s MSCs stimulovanými oligomycinem došlo

k výraznému poklesu procenta živých neaktivovaných T-lymfocytů, ne však T-lymfocytů aktivovaných konkanavalinem A. Možným vysvětlením rozdílu v přežívání aktivovaných a neaktivovaných T-lymfocytů kokultivovaných s MSCs stimulovanými oligomycinem je odlišný způsob zpracování poškozených mitochondrií přijatých od MSCs. Depolarizované mitochondrie mohou být začleněny do mitochondriální sítě a obnovit svou funkci (Phinney et al., 2015), nebo mohou být degradovány mitofagií. V případě, že se buňka s poškozenými mitochondriemi vypořádá nedokáže, dochází k indukci buněčné smrti (López De Figueroa et al., 2015). Abychom rozdíl v přežívání aktivovaných a neaktivovaných T-lymfocytů kultivovaných v přítomnosti MSCs ovlivněných oligomycinem objasnili, je zapotřebí dalších experimentů, které by ukázaly, zda v T-lymfocytech dochází k aktivaci mitofagie, apoptotických procesů či ke změnám v energetickém metabolismu. Po 72 hodinách kultivace jsme pozorovali klesající tendenci přežívání aktivovaných T-lymfocytů kokultivovaných s MSCs, signifikantní pokles procenta živých buněk byl detekován u CD8⁺ T-lymfocytů kultivovaných v přítomnosti stimulovaných MSCs (obrázek 22). Zároveň jsme ukázali, že CD4⁺ i CD8⁺ buňky aktivované konkanavalinem A v přítomnosti MSCs po dobu 72 hodin vykazují sníženou proliferaci (obrázek 24), přičemž stimulované MSCs potlačují proliferaci více než MSCs nestimulované. Potlačení proliferace a přežívání aktivovaných T-lymfocytů je v souladu s obecnými imunomodulačními vlastnostmi MSCs (Akiyama et al., 2012; Glennie et al., 2005). Se sníženou proliferací koreluje snížení aktivace T-lymfocytů (obrázek 23), kterou jsme určili na základě povrchové exprese molekuly CD25, jež je považována za aktivační marker T-lymfocytů (Caruso et al., 1997). Potlačení aktivace T-lymfocytů po kokultivaci s MSCs pozorovali ve své práci také Akhter a kolegové (Akhter et al., 2023). Pro proliferaci T-lymfocytů je vyžadován cytokin IL-2 (D'Souza & Lefrançois, 2003). Některé z publikovaných studií udávají, že MSCs produkci IL-2 T-lymfocyty potlačují (Laranjeira et al., 2015; Park et al., 2011). V naší práci jsme nepozorovali výrazné změny v produkci IL-2 CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty po kokultivaci splenocytů s nestimulovanými MSCs a MSCs stimulovanými IGF-1. Velmi nás ale překvapil nárůst produkce IL-2 CD4⁺ i CD8⁺ buňkami po kokultivaci s MSCs ovlivněnými oligomycinem (obrázek 26). Důležité je zdůraznit, že v této práci byl detekován pouze intracelulární IL-2. To, zda je cytokin sekretován, je potřeba ověřit s využitím metody ELISA. Z důvodu omezeného času na vypracování diplomového projektu jsme však potvrzení sekrece cytokinů nestihli provést. Na základě doposud získaných výsledků nárůst intracelulárního IL-2 nedokážeme vysvětlit.

Dále jsme chtěli vědět, jaký vliv mají MSCs stimulované IGF-1, nebo oligomycinem na polarizaci CD4⁺ T-lymfocytů. Z dosavadních studií vyplývá, že MSCs podporují vznik T-lymfocytů s protizánětlivým a regulačním fenotypem. Oproti tomu prozánětlivá Th1 a Th17 odpověď je vlivem MSCs potlačena (Akhter et al., 2023; Luz-Crawford et al., 2019; Park et al., 2015). V souladu s tím jsou naše výsledky, které ukázaly signifikantní nárůst Foxp3⁺CD4⁺ Treg po kokultivaci splenocytů s MSCs, přičemž nebyl detekován rozdíl mezi působením MSCs nestimulovaných a MSCs ovlivněných (obrázek 25). Zároveň jsme pozorovali nárůst v produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 CD4⁺ buňkami po kokultivaci s MSCs nestimulovanými a MSCs stimulovanými IGF-1 (obrázek 26). I přes to, že detekovaný nárůst nebyl signifikantní, poukazují tato data na indukci imunosupresivního fenotypu CD4⁺ T-lymfocytů. Dále jsme pozorovali pokles produkce prozánětlivého IL-17 po kokultivaci CD4⁺ T-lymfocytů s MSCs, signifikantní po kokultivaci s MSCs ovlivněnými oligomycinem (obrázek 26). Avšak nedetekovali jsme výrazné změny exprese RORγt v CD4⁺ buňkách po kokultivaci s MSCs (obrázek 25). Tyto výsledky poukazují na možný vznik CD4⁺ T-lymfocytů se smíšeným fenotypem, které byly již několikrát popsány (Furuyama et al., 2022; Kim et al., 2017; Martínez-Blanco et al., 2021). Pro lepší pochopení vlivu stimulovaných MSCs na T-lymfocyty jsou vyžadovány další experimenty. Mitochondriální přenos není jediný mechanismus využívaný MSCs k imunosupresi. MSCs mohou produkovat různé imunomodulační molekuly, EV s mikroRNA či interagovat s imunitními buňkami prostřednictvím povrchových molekul (Akiyama et al., 2012; Kim et al., 2020; Liu et al., 2019). Abychom zohlednili i tyto mechanismy je potřeba provést detailnější analýzu MSCs. Zajímavé by bylo měřit například sekretom MSCs a podívat se, zda má stimulace MSCs IGF-1, nebo oligomycinem vliv na sekreci imunomodulačních molekul. Dále je potřeba doměřit další parametry u T-lymfocytů – metabolické změny po kultivaci s MSCs, apoptózu, popřípadě produkci dalších cytokinů.

Nakonec jsme chtěli zjistit, jestli přijetí mitochondrií z MSCs ovlivní fenotyp T-lymfocytů. T-lymfocyty byly v závislosti na množství přijatých mitochondrií rozděleny na dvě skupiny – ty, které mitochondrie od MSCs nezískaly nebo jich přijaly málo, a ty, které přijaly více mitochondrií. Následně jsme se u těchto buněk podívali na povrchovou expresi CD25, expresi transkripčních faktorů Ki-67, Foxp3 a RORγt a produkci cytokinů IL-2, IL-10 a IL-17. Výsledky ukázaly snížený přenos mitochondrií do Foxp3⁺CD4⁺ buněk (obrázek 25). Klesající trend byl pozorován také u IL-10⁺CD4⁺ buněk (obrázek 26). Naopak RORγt⁺ a IL-17⁺CD4⁺ buňky vykazovaly vyšší příjem mitochondrií (obrázky 25, 26). Zvýšená tendence

přijímat mitochondrie od MSCs byla pozorována také u CD25⁺ a Ki-67⁺ T-lymfocytů, vyjma skupiny s MSCs stimulovanými oligomycinem (obrázky 23, 24). Z těchto výsledků vyplývá, že mitochondrie z nestimulovaných i stimulovaných MSCs jsou přenášeny preferenčně do aktivovaných T-lymfocytů s prozánětlivým fenotypem, což je v souladu s výsledky z naší laboratoře. Zvýšená produkce ROS v recipientních buňkách je jeden ze signálů, který indukuje přenos mitochondrií z MSCs (Burt et al., 2019). Zároveň bylo popsáno, že Treg obsahují méně intracelulárních ROS než efektorové T-lymfocyty, a to pravděpodobně z důvodu vyšší antioxidační kapacity Treg (Kurniawan et al., 2020). Na základě těchto informací usuzujeme, že snížený mitochondriální přenos z MSCs do Treg je spojen s nižším množstvím intracelulárních ROS v těchto buňkách.

V této práci jsme ukázali, že přenos mitochondrií z MSCs do T-lymfocytů se zvyšuje po stimulaci MSCs IGF-1, nebo oligomycinem a probíhá preferenčně do aktivovaných prozánětlivých buněk. MSCs stimulované IGF-1, nebo oligomycinem si zachovávají imunosupresivní potenciál, potlačují aktivaci a proliferaci T-lymfocytů a podporují vznik Treg. Korelaci mezi zvýšeným mitochondriálním přenosem a mírou imunosuprese jsme však nepotvrdili, což poukazuje na to, že imunomodulace zprostředkovaná MSCs je komplexní proces, na kterém se podílí řada mechanismů. Abychom lépe porozuměli působení MSCs stimulovaných IGF-1, nebo oligomycinem na T-lymfocyty a změnám, k nimž v T-lymfocytech dochází, je potřeba dalších experimentů.

7 Závěr

- U MSCs stimulovaných rapamycinem jsme prokázali aktivaci mitofagie. Předpokládali jsme tudíž, že budou z důvodu poklesu množství mitochondrií v buňce vykazovat nižší mitochondriální přenos. Avšak tato hypotéza se nepotvrdila. U MSCs stimulovaných rapamycinem jsme nedekovali změny v mitochondriální mase ani v jejich schopnosti předávat mitochondrie imunitním buňkám.
- Aktivaci imunosupresivního působení MSCs po ovlivnění IFN γ jsme potvrdili na základě zvýšené tvorby NO. Stimulace IFN γ neměla vliv na mitochondrie MSCs ani jejich přenos do imunitních buněk.
- Ukázali jsme, že stimulace MSCs IGF-1 podporuje přenos mitochondrií do imunitních buněk. Předpokládali jsme, že ke zvýšení mitochondriálního přenosu dochází z důvodu aktivace biogeneze mitochondrií. To jsme ale nepotvrdili. Po stimulaci MSCs IGF-1 nebyly pozorovány změny ani v mitochondriální dynamice, mitofagii, metabolismu či produkci ROS. Fluorescenční mikroskopie ukázala odlišné uspořádání mitochondrií v MSCs stimulovaných IGF-1 – mitochondrie nebyly umístěny pouze kolem jádra. Umístění mitochondrií blíže plazmatické membráně by se mohlo podílet na zvýšení přenosu mitochondrií z MSCs ovlivněných IGF-1. Je však zapotřebí dalšího výzkumu, který by objasnil mechanismus působení IGF-1 na MSCs a jejich mitochondrie.
- U MSCs stimulovaných oligomycinem jsme potvrdili inhibici oxidativní fosforylace. Zároveň jsme u nich detekovali fragmentaci mitochondrií související s mitochondriální dysfunkcí a výrazný nárůst v přenosu mitochondrií do T-lymfocytů. Zvýšení mitochondriálního přenosu si vysvětlujeme tím, že se MSCs ovlivněné oligomycinem zbavují poškozených mitochondrií jejich uvolněním z buňky, aby si zajistily vlastní přežití. Uvolněné mitochondrie jsou následně přijaty okolními buňkami. Další studie jsou však potřeba, abychom zjistili, jak recipientní buňky přijaté mitochondrie zpracovávají.
- Zaznamenali jsme, že přenos mitochondrií probíhá preferenčně do prozánětlivých aktivovaných T-lymfocytů.
- Ukázali jsme, že MSCs stimulované IGF-1, nebo oligomycinem potlačují aktivaci a proliferaci T-lymfocytů a podporují vznik Treg. Imunosupresivní potenciál MSCs je tudíž zachován i po jejich stimulaci. Na základě získaných výsledků však nejsme schopni vysvětlit všechny změny, k nimž v T-lymfocytech po kokultivaci s MSCs dochází, a proto je potřeba dalších studií.

8 Seznam použité literatury

- Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P. F., Figeac, F., Coudert, A. E., Le Coz, O., Christov, C., Baudin, X., Auber, F., Ylou, R., Dubois-Randé, J. L., & Anne-Marie, R. (2011). Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells*, *29*(5). <https://doi.org/10.1002/stem.632>
- Agrawal, M., Rasiah, P. K., Bajwa, A., Rajasingh, J., & Gangaraju, R. (2021). Mesenchymal stem cell induced foxp3(+) tregs suppress effector t cells and protect against retinal ischemic injury. *Cells*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/cells10113006>
- Akhter, W., Nakhle, J., Vaillant, L., Garcin, G., Le Saout, C., Simon, M., Crozet, C., Djouad, F., Jorgensen, C., Vignais, M. L., & Hernandez, J. (2023). Transfer of mesenchymal stem cell mitochondria to CD4+ T cells contributes to repress Th1 differentiation by downregulating T-bet expression. *Stem Cell Research and Therapy*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03219-x>
- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., & Shi, S. (2012). Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, *10*(5). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.007>
- Azevedo, R. I., Minskaia, E., Fernandes-Platzgummer, A., Vieira, A. I. S., da Silva, C. L., Cabral, J. M. S., & Lacerda, J. F. (2020). Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells in vitro. *Stem Cells*, *38*(8). <https://doi.org/10.1002/stem.3185>
- Bae, K. S., Park, J. B., Kim, H. S., Kim, D. S., Park, D. J., & Kang, S. J. (2011). Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Medical Journal*, *52*(3). <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.3.401>
- Basu, K., Lajoie, D., Aumentado-Armstrong, T., Chen, J., Koning, R. I., Bossy, B., Bostina, M., Sik, A., Bossy-Wetzel, E., & Rouiller, I. (2017). Molecular mechanism of DRP1 assembly studied in vitro by cryo-electron microscopy. *PLoS ONE*, *12*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179397>
- Beegle, J., Lakatos, K., Kalomoiris, S., Stewart, H., Isseroff, R. R., Nolte, J. A., & Fierro, F. A. (2015). Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells*, *33*(6). <https://doi.org/10.1002/stem.1976>
- Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2007). Human Mesenchymal Stem Cells Promote Survival of T Cells in a Quiescent State. *Stem Cells*, *25*(7). <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0068>
- Braza, F., Dirou, S., Forest, V., Sauzeau, V., Hassoun, D., Chesné, J., Cheminant-Muller, M. A., Sagan, C., Magnan, A., & Lemarchand, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells Induce Suppressive Macrophages Through Phagocytosis in a Mouse Model of Asthma. *Stem Cells*, *34*(7). <https://doi.org/10.1002/stem.2344>
- Burt, R., Dey, A., Aref, S., Aguiar, M., Akarca, A., Bailey, K., Day, W., Hooper, S., Kirkwood, A., Kirschner, K., Lee, S. W., Celso, C. Lo, Manji, J., Mansour, M. R., Marafioti, T., Mitchell, R. J., Muirhead, R. C., Ng, K. C. Y., Pospori, C., ... Fielding, A. K. (2019). Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood*, *134*(17). <https://doi.org/10.1182/blood.2019001398>

- Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M., Canaris, A. D., De Francesco, M. A., Fiorentini, S., Peroni, L., Fallacara, F., Dima, F., Balsari, A., & Turano, A. (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*, *27*(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19970101\)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O)
- Chen, C.-T., Shih, Y.-R. V., Kuo, T. K., Lee, O. K., & Wei, Y.-H. (2008). Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, *26*(4). <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0509>
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>
- Contreras-Lopez, R., Elizondo-Vega, R., Luque-Campos, N., Torres, M. J., Pradenas, C., Tejedor, G., Paredes-Martínez, M. J., Vega-Letter, A. M., Campos-Mora, M., Rigual-Gonzalez, Y., Oyarce, K., Salgado, M., Jorgensen, C., Khoury, M., de los Ángeles Garcia-Robles, M., Altamirano, C., Djouad, F., & Luz-Crawford, P. (2020). The ATP synthase inhibition induces an AMPK-dependent glycolytic switch of mesenchymal stem cells that enhances their immunotherapeutic potential. *Theranostics*, *11*(1). <https://doi.org/10.7150/thno.51631>
- Court, A. C., Le-Gatt, A., Luz-Crawford, P., Parra, E., Aliaga-Tobar, V., Bátiz, L. F., Contreras, R. A., Ortúzar, M. I., Kurte, M., Elizondo-Vega, R., Maracaja-Coutinho, V., Pino-Lagos, K., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2020). Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Reports*, *21*(2). <https://doi.org/10.15252/embr.201948052>
- Crane, J. L., Zhao, L., Frye, J. S., Xian, L., Qiu, T., & Cao, X. (2013). IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Research*, *1*. <https://doi.org/10.4248/BR201302007>
- D'Souza, W. N., & Lefrançois, L. (2003). IL-2 Is Not Required for the Initiation of CD8 T Cell Cycling but Sustains Expansion. *The Journal of Immunology*, *171*(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.5727>
- Das, S., Joshi, M. B., Parashiva, G. K., & Rao, S. B. S. (2020). Stimulation of cytoprotective autophagy and components of mitochondrial biogenesis / proteostasis in response to ionizing radiation as a credible pro-survival strategy. *Free Radical Biology and Medicine*, *152*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.015>
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism*, *44*(8). [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200108\)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P)
- De Carvalho, L. R. P., Abreu, S. C., De Castro, L. L., Andrade Da Silva, L. H., Silva, P. M., Vieira, J. B., Santos, R. T., Cabral, M. R., Khoury, M., Weiss, D. J., Lopes-Pacheco, M., Silva, P. L., Cruz, F. F., & Rocco, P. R. M. E. (2021). Mitochondria-Rich Fraction Isolated From Mesenchymal Stromal Cells Reduces Lung and Distal Organ Injury in Experimental Sepsis. *Critical Care Medicine*, *49*(9). <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000005056>
- de Witte, S. F. H., Lambert, E. E., Merino, A., Strini, T., Douben, H. J. C. W., O'Flynn, L., Elliman, S. J., de Klein, A. J. E. M. M., Newsome, P. N., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2017). Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytotherapy*, *19*(7). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.071>

- Do, J. su, Zwick, D., Kenyon, J. D., Zhong, F., Askew, D., Huang, A. Y., Van't Hof, W., Finney, M., & Laughlin, M. J. (2021). Mesenchymal stromal cell mitochondrial transfer to human induced T-regulatory cells mediates FOXP3 stability. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90115-8>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4). <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dreyer, G. J., Groeneweg, K. E., Heidt, S., Roelen, D. L., van Pel, M., Roelofs, H., Huurman, V. A. L., Bajema, I. M., Moes, D. J. A. R., Fibbe, W. E., Claas, F. H. J., van Kooten, C., Rabelink, R. J., de Fijter, J. W., & Reinders, M. E. J. (2020). Human leukocyte antigen selected allogeneic mesenchymal stromal cell therapy in renal transplantation: The Neptune study, a phase I single-center study. *American Journal of Transplantation*, *20*(10). <https://doi.org/10.1111/ajt.15910>
- Estrada, J. C., Albo, C., Benguría, A., Dopazo, A., López-Romero, P., Carrera-Quintanar, L., Roche, E., Clemente, E. P., Enríquez, J. A., Bernad, A., & Samper, E. (2012). Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death and Differentiation*, *19*(5). <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.172>
- Fan, P., Yu, X. Y., Xie, X. H., Chen, C. H., Zhang, P., Yang, C., Peng, X., & Wang, Y. T. (2019). Mitophagy is a protective response against oxidative damage in bone marrow mesenchymal stem cells. *Life Sciences*, *229*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.027>
- *Fan, X. L., Zhang, Y., Li, X., & Fu, Q. L. (2020). Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *77*(14). <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03454-6>
- Feng, X., Yin, W., Wang, J., Feng, L., & Kang, Y. J. (2021). Mitophagy promotes the stemness of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, *246*(1). <https://doi.org/10.1177/1535370220964394>
- Feng, X., Zhang, W., Yin, W., & Kang, Y. J. (2019). Feature Article: The involvement of mitochondrial fission in maintenance of the stemness of bone marrow mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, *244*(1). <https://doi.org/10.1177/1535370218821063>
- Forni, M. F., Pelligia, J., Trudeau, K., Shirihai, O., & Kowaltowski, A. J. (2016). Murine mesenchymal stem cell commitment to differentiation is regulated by mitochondrial dynamics. *Stem Cells*, *34*(3). <https://doi.org/10.1002/stem.2248>
- Forte, D., García-Fernández, M., Sánchez-Aguilera, A., Stavropoulou, V., Fielding, C., Martín-Pérez, D., López, J. A., Costa, A. S. H., Tronci, L., Nikitopoulou, E., Barber, M., Gallipoli, P., Marando, L., Fernández de Castillejo, C. L., Tzankov, A., Dietmann, S., Cavo, M., Catani, L., Curti, A., ... Méndez-Ferrer, S. (2020). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Support Acute Myeloid Leukemia Bioenergetics and Enhance Antioxidant Defense and Escape from Chemotherapy. *Cell Metabolism*, *32*(5). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.09.001>
- Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic reprogramming of macrophages: Glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(11). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>

- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
- Furuyama, K., Kondo, Y., Shimizu, M., Yokosawa, M., Segawa, S., Iizuka, A., Tanimura, R., Tsuboi, H., Matsumoto, I., & Sumida, T. (2022). ROR γ t+Foxp3+regulatory T cells in the regulation of autoimmune arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 207(2). <https://doi.org/10.1093/cei/uxab007>
- Giri, J., Das, R., Nylen, E., Chinnadurai, R., & Galipeau, J. (2020). CCL2 and CXCL12 Derived from Mesenchymal Stromal Cells Cooperatively Polarize IL-10+ Tissue Macrophages to Mitigate Gut Injury. *Cell Reports*, 30(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.047>
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W. F., & Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105(7). <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>
- Guan, X., Yan, Q., Wang, D., Du, G., & Zhou, J. (2022). IGF-1 Signaling Regulates Mitochondrial Remodeling during Myogenic Differentiation. *Nutrients*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/nu14061249>
- Guo, L., Du, J., Yuan, D. F., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, H. C., Mi, J. W., Ning, Y. L., Chen, M. J., Wen, D. L., Sun, J. H., Liu, D., Zeng, L., Zhang, A., Jiang, J., & Huang, H. (2020). Optimal H2O2 preconditioning to improve bone marrow mesenchymal stem cells engraftment in wound healing. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01910-5>
- Higuchi, M., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. T. F., Chan, E. C., & Liu, G. S. (2013). Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box o1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells and Development*, 22(6). <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0306>
- Howie, D., Cobbold, S. P., Adams, E., Bokum, A. Ten, Necula, A. S., Zhang, W., Huang, H., Roberts, D. J., Thomas, B., Hester, S. S., Vaux, D. J., Betz, A. G., & Waldmann, H. (2017). Foxp3 drives oxidative phosphorylation and protection from lipotoxicity. *JCI Insight*, 2(3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89160>
- Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D. J., Quadri, S. K., Bhattacharya, S., & Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature Medicine*, 18(5). <https://doi.org/10.1038/nm.2736>
- Jackson, M. V., Morrison, T. J., Doherty, D. F., McAuley, D. F., Matthay, M. A., Kissenpfennig, A., O’Kane, C. M., & Krasnodembskaya, A. D. (2016). Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells*, 34(8). <https://doi.org/10.1002/stem.2372>
- Javorkova, E., Trosan, P., Zajicova, A., Krulova, M., Hajkova, M., & Holan, V. (2014). Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon- γ -treated mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Development*, 23(20). <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0568>
- Jeong, S. G., & Cho, G. W. (2015). Endogenous ROS levels are increased in replicative senescence in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.136>

- Jiang, D., Gao, F., Zhang, Y., Wong, D. S. H., Li, Q., Tse, H. F., Xu, G., Yu, Z., & Lian, Q. (2016). Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. *Cell Death and Disease*, 7(11). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.358>
- Kim, B. S., Lu, H., Ichiyama, K., Chen, X., Zhang, Y. B., Mistry, N. A., Tanaka, K., Lee, Y. hee, Nurieva, R., Zhang, L., Yang, X., Chung, Y., Jin, W., Chang, S. H., & Dong, C. (2017). Generation of ROR γ t⁺ Antigen-Specific T Regulatory 17 Cells from Foxp3⁺ Precursors in Autoimmunity. *Cell Reports*, 21(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.021>
- Kim, D. S., Jang, I. K., Lee, M. W., Ko, Y. J., Lee, D. H., Lee, J. W., Sung, K. W., Koo, H. H., & Yoo, K. H. (2018). Enhanced Immunosuppressive Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Primed by Interferon- γ . *eBioMedicine*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.002>
- Kim, H., Lee, M. J., Bae, E. H., Ryu, J. S., Kaur, G., Kim, H. J., Kim, J. Y., Barreda, H., Jung, S. Y., Choi, J. M., Shigemoto-Kuroda, T., Oh, J. Y., & Lee, R. H. (2020). Comprehensive Molecular Profiles of Functionally Effective MSC-Derived Extracellular Vesicles in Immunomodulation. *Molecular Therapy*, 28(7). <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.020>
- Kim, K. W., Moon, S. J., Park, M. J., Kim, B. M., Kim, E. K., Lee, S. H., Lee, E. J., Chung, B. H., Yang, C. W., & Cho, M. L. (2015). Optimization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by rapamycin in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0197-8>
- Konari, N., Nagaishi, K., Kikuchi, S., & Fujimiya, M. (2019). Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40163-y>
- Kornicka, K., Marycz, K., Tomaszewski, K. A., Marędziak, M., & Smieszek, A. (2015). The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/309169>
- Kumar, A., Kim, J. H., Ranjan, P., Metcalfe, M. G., Cao, W., Mishina, M., Gangappa, S., Guo, Z., Boyden, E. S., Zaki, S., York, I., García-Sastre, A., Shaw, M., & Sambhara, S. (2017). Influenza virus exploits tunneling nanotubes for cell-to-cell spread. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep40360>
- Kurniawan, H., Franchina, D. G., Guerra, L., Bonetti, L., Baguet, L. S., Grusdat, M., Schlicker, L., Hunewald, O., Dostert, C., Merz, M. P., Binsfeld, C., Duncan, G. S., Farinelle, S., Nonnenmacher, Y., Haight, J., Das Gupta, D., Ewen, A., Taskesen, R., Halder, R., ... Brenner, D. (2020). Glutathione Restricts Serine Metabolism to Preserve Regulatory T Cell Function. *Cell Metabolism*, 31(5). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.03.004>
- Kurtzberg, J., Abdel-Azim, H., Carpenter, P., Chaudhury, S., Horn, B., Mahadeo, K., Nemecek, E., Neudorf, S., Prasad, V., Prockop, S., Quigg, T., Satwani, P., Cheng, A., Burke, E., Hayes, J., & Skerrett, D. (2020). A Phase 3, Single-Arm, Prospective Study of Remestemcel-L, Ex Vivo Culture-Expanded Adult Human Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Pediatric Patients Who Failed to Respond to Steroid Treatment for Acute Graft-versus-Host Disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 26(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2020.01.018>
- Laranjeira, P., Pedrosa, M., Pedreiro, S., Gomes, J., Martinho, A., Antunes, B., Ribeiro, T., Santos, F., Trindade, H., & Paiva, A. (2015). Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/srct537>

- Lee, K. Der, Kuo, T. K. C., Whang-Peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., Chen, J. R., Chen, Y. P., & Lee, O. K. S. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, *40*(6). <https://doi.org/10.1002/hep.20469>
- Lee, H. R., Kim, S., Shin, S., Jeong, S. Y., Lee, D. W., Lim, S. U., Kang, J. Y., Son, M. Y., Lee, C., Yu, K. R., Kim, M., & Oh, I. H. (2023). iPSC-Derived MSCs Are a Distinct Entity of MSCs with Higher Therapeutic Potential than Their Donor-Matched Parental MSCs. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010881>
- Lee, J. H., Yoon, Y. M., Song, K. H., Noh, H., & Lee, S. H. (2020). Melatonin suppresses senescence-derived mitochondrial dysfunction in mesenchymal stem cells via the HSPA1L–mitophagy pathway. *Aging Cell*, *19*(3). <https://doi.org/10.1111/acer.13111>
- Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. Der, Hsieh, S. L., & Chen, T. H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, *103*(5). <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1670>
- Lemasters, J. J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Research*, *8*(1). <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>
- Li, C. J., Chen, P. K., Sun, L. Y., & Pang, C. Y. (2017). Enhancement of Mitochondrial Transfer by Antioxidants in Human Mesenchymal Stem Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/8510805>
- Li, M., Soder, R., Abhyankar, S., Abdelhakim, H., Braun, M. W., Trinidad, C. V., Pathak, H. B., Pessetto, Z., Deighan, C., Ganguly, S., Dawn, B., McGuirk, J., Dunavin, N., & Godwin, A. K. (2021). WJMSC-derived small extracellular vesicle enhance T cell suppression through PD-L1. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(4). <https://doi.org/10.1002/jev2.12067>
- Li, X., Hong, Y., He, H., Jiang, G., You, W., Liang, X., Fu, Q., Han, S., Lian, Q., & Zhang, Y. (2019). FGF21 mediates mesenchymal stem cell senescence via regulation of mitochondrial dynamics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*. <https://doi.org/10.1155/2019/4915149>
- Li, Z. H., Wang, Y. L., Wang, H. J., Wu, J. H., & Tan, Y. Z.. (2020). Rapamycin-Preactivated Autophagy Enhances Survival and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Infarcted Myocardium. *Stem Cell Reviews and Reports*, *16*(2). <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09952-1>
- Liang, X., Zhang, Y., Lin, F., Li, M., Li, X., Chen, Y., Liu, J., Meng, Q., Ma, X., Wang, E., Wei, L., He, Z., Fan, H., Zhou, X., Ding, Y., & Liu, Z. (2023). Direct administration of mesenchymal stem cell-derived mitochondria improves cardiac function after infarction via ameliorating endothelial senescence. *Bioengineering and Translational Medicine*, *8*(1). <https://doi.org/10.1002/btm2.10365>
- Lin, C. H., Li, N. T., Cheng, H. S., & Yen, M. L. (2018). Oxidative stress induces imbalance of adipogenic/osteoblastic lineage commitment in mesenchymal stem cells through decreasing SIRT1 functions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(2). <https://doi.org/10.1111/jcmm.13356>
- Liu, F., Qiu, H., Xue, M., Zhang, S., Zhang, X., Xu, J., Chen, J., Yang, Y., & Xie, J. (2019). MSC-secreted TGF- β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cell Research and Therapy*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1447-y>

- Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., & Yan, C. (2014). Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular Research*, 92. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.01.008>
- Liu, Y., Yuan, X., Muñoz, N., Logan, T. M., & Ma, T. (2019). Commitment to Aerobic Glycolysis Sustains Immunosuppression of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0070>
- Longobardi, L., O'Rear, L., Aakula, S., Johnstone, B., Shimer, K., Chytil, A., Horton, W. A., Moses, H. L., & Spagnoli, A. (2006). Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(4). <https://doi.org/10.1359/jbmr.051213>
- López De Figuerola, P., Lotz, M. K., Blanco, F. J., & Caramés, B. (2015). Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis and Rheumatology*, 67(4). <https://doi.org/10.1002/art.39025>
- Lu, J. J., Yang, W. M., Li, F., Zhu, W., & Chen, Z. (2019). Tunneling nanotubes mediated microRNA-155 intercellular transportation promotes bladder cancer cells' invasive and proliferative capacity. *International Journal of Nanomedicine*, 14. <https://doi.org/10.2147/IJN.S217277>
- Lu, T., Zhang, J., Cai, J., Xiao, J., Sui, X., Yuan, X., Li, R., Li, Y., Yao, J., Lv, G., Chen, X., Chen, H., Zeng, K., Liu, Y., Chen, W., Chen, G., Yang, Y., Zheng, J., & Zhang, Y. (2022). Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells as nanotherapeutics for liver ischaemia-reperfusion injury by transferring mitochondria to modulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Biomaterials*, 284. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121486>
- Luz-Crawford, P., Hernandez, J., Djouad, F., Luque-Campos, N., Caicedo, A., Carrère-Kremer, S., Brondello, J. M., Vignais, M. L., Pène, J., & Jorgensen, C. (2019). Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1307-9>
- Lyons, A., Coleman, M., Riis, S., Favre, C., O'Flanagan, C. H., Zhdanov, A. V., Papkovsky, D. B., Hursting, S. D., & O'Connor, R. (2017). Insulin-like growth factor 1 signaling is essential for mitochondrial biogenesis and mitophagy in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.792838>
- Lyublinskaya, O. G., Borisov, Y. G., Pugovkina, N. A., Smirnova, I. S., Obidina, J. V., Ivanova, J. S., Zenin, V. V., Shatrova, A. N., Borodkina, A. V., Aksenov, N. D., Zemelko, V. I., Burova, E. B., Puzanov, M. V., & Nikolsky, N. N. (2015). Reactive oxygen species are required for human mesenchymal stem cells to initiate proliferation after the quiescence exit. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/502105>
- Ma, L., Feng, X., Wang, K., Song, Y., Luo, R., & Yang, C. (2020). Dexamethasone promotes mesenchymal stem cell apoptosis and inhibits osteogenesis by disrupting mitochondrial dynamics. *FEBS Open Bio*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12771>
- 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-Randé, J. L., Motterlini, R., Foresti, R., & 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). <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.51>

- Martínez-Blanco, M., Lozano-Ojalvo, D., Pérez-Rodríguez, L., Benedé, S., Molina, E., & López-Fandiño, R. (2021). Retinoic Acid Induces Functionally Suppressive Foxp3+ROR γ t+ T Cells In Vitro. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.675733>
- Mckinnirey, F., Herbert, B., Vesey, G., & McCracken, S. (2021). Immune modulation via adipose derived Mesenchymal Stem cells is driven by donor sex in vitro. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91870-4>
- Menk, A. V., Scharping, N. E., Moreci, R. S., Zeng, X., Guy, C., Salvatore, S., Bae, H., Xie, J., Young, H. A., Wendell, S. G., & Delgoffe, G. M. (2018). Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions. *Cell Reports*, *22*(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.040>
- Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Qian, H., & Zhang, X. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, *30*(9). <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.03.009>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, *164*(12). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., & Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: A donor-matched comparison. *Stem Cell Research and Therapy*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>
- Mori, D., Miyagawa, S., Kawamura, T., Yoshioka, D., Hata, H., Ueno, T., Toda, K., Kuratani, T., Oota, M., Kawai, K., Kurata, H., Nishida, H., Harada, A., Toyofuku, T., & Sawa, Y. (2023). Mitochondrial Transfer Induced by Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Improves Cardiac Function in Rat Models of Ischemic Cardiomyopathy. *Cell Transplantation*, *32*. <https://doi.org/10.1177/09636897221148457>
- Morrison, T. J., Jackson, M. V., Cunningham, E. K., Kissenpfennig, A., McAuley, D. F., O’Kane, C. M., & Krasnodembskaya, A. D. (2017). Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *196*(10). <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-01700C>
- Moya, A., Larochette, N., Paquet, J., Deschepper, M., Bensidhoum, M., Izzo, V., Kroemer, G., Petite, H., & Logeart-Avramoglou, D. (2017). Quiescence Preconditioned Human Multipotent Stromal Cells Adopt a Metabolic Profile Favorable for Enhanced Survival under Ischemia. *Stem Cells*, *35*(1). <https://doi.org/10.1002/stem.2493>
- Moya, A., Paquet, J., Deschepper, M., Larochette, N., Oudina, K., Denoëud, C., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., & Petite, H. (2018). Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation. *Stem Cells*, *36*(3). <https://doi.org/10.1002/stem.2763>
- Pagella, P., de Vargas Roditi, L., Stadlinger, B., Moor, A. E., & Mitsiadis, T. A. (2021). Notch signaling in the dynamics of perivascular stem cells and their niches. *Stem Cells Translational Medicine*, *10*(10). <https://doi.org/10.1002/sctm.21-0086>
- Pan, T., Rawal, P., Wu, Y., Xie, W., Jankovic, J., & Le, W. (2009). Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*, *164*(2). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.014>

- Panasiuk, M., Rychłowski, M., Derewońko, N., & Bieńkowska-Szewczyk, K. (2018). Tunneling Nanotubes as a Novel Route of Cell-to-Cell Spread of Herpesviruses. *Journal of Virology*, *92*(10). <https://doi.org/10.1128/jvi.00090-18>
- Park, M. J., Kwok, S. K., Lee, S. H., Kim, E. K., Park, S. H., & Cho, M. La. (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of interleukin-10-producing regulatory b cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Cell Transplantation*, *24*(11). <https://doi.org/10.3727/096368914X685645>
- Park, M. J., Shin, J. S., Kim, Y. H., Hong, S. H., Yang, S. H., Shin, J. Y., Kim, S. Y., Kim, B., Kim, J. S., & Park, C. G. (2011). Murine Mesenchymal Stem Cells Suppress T Lymphocyte Activation Through IL-2 Receptor α (CD25) Cleavage by Producing Matrix Metalloproteinases. *Stem Cell Reviews and Reports*, *7*(2). <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9203-9>
- Pedrazza, L., Lunardelli, A., Luft, C., Cruz, C. U., De Mesquita, F. C., Bitencourt, S., Nunes, F. B., & De Oliveira, J. R. (2014). Mesenchymal stem cells decrease splenocytes apoptosis in a sepsis experimental model. *Inflammation Research*, *63*(9). <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0745-1>
- Phinney, D. G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C. M., Stolz, D. B., Watkins, S. C., Di, Y. P., Leikauf, G. D., Kolls, J., Riches, D. W. H., Deiluiis, G., Kaminski, N., Boregowda, S. V., McKenna, D. H., & Ortiz, L. A. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms9472>
- Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Staffolani, N., Franchina, M., Grossi, A., & Bagnara, G. P. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, *80*(6). <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000173794.72151.88>
- Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G. W., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., & Bartholomew, A. (2008). IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European Journal of Immunology*, *38*(6). <https://doi.org/10.1002/eji.200738129>
- Porubská, B., Vasek, D., Somova, V., Hajkova, M., Hlaviznova, M., Tlapakova, T., Holan, V., & Krulova, M. (2021). Sertoli Cells Possess Immunomodulatory Properties and the Ability of Mitochondrial Transfer Similar to Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *17*(5). <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10197-9>
- Pourmohammadi-Bejarpasi, Z., Roushandeh, A. M., Saberi, A., Rostami, M. K., Toosi, S. M. R., Jahanian-Najafabadi, A., Tomita, K., Kuwahara, Y., Sato, T., & Roudkenar, M. H. (2020). Mesenchymal stem cells-derived mitochondria transplantation mitigates I/R-induced injury, abolishes I/R-induced apoptosis, and restores motor function in acute ischemia stroke rat model. *Brain Research Bulletin*, *165*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.09.018>
- Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*, *1*(1). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.005>
- Rashedi, I., Gómez-Aristizábal, A., Wang, X. H., Viswanathan, S., & Keating, A. (2017). TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling. *Stem Cells*, *35*(1). <https://doi.org/10.1002/stem.2485>

- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>
- Riis, S., Murray, J. B., & O'Connor, R. (2020). IGF-1 signalling regulates mitochondria dynamics and turnover through a conserved GSK-3 β -Nrf2-BNIP3 pathway. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010147>
- Sagar, S., Faizan, M. I., Chaudhary, N., Singh, V., Singh, P., Gheware, A., Sharma, K., Azmi, I., Singh, V. P., Kharya, G., Mabalirajan, U., Agrawal, A., Ahmad, T., & Sinha Roy, S. (2023). Obesity impairs cardiolipin-dependent mitophagy and therapeutic intercellular mitochondrial transfer ability of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Disease*, 14(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05810-3>
- *Salazar-Noratto, G. E., Luo, G., Denoed, C., Padrona, M., Moya, A., Bensidhoum, M., Bizios, R., Potier, E., Logeart-Avramoglou, D., & Petite, H. (2020). Understanding and leveraging cell metabolism to enhance mesenchymal stem cell transplantation survival in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells*, 38(1). <https://doi.org/10.1002/stem.3079>
- Salingcarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A., & Noda, M. (2003). Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental Cell Research*, 287(2). [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00107-1)
- Sanchez, V., Villalba, N., Fiore, L., Luzzani, C., Miriuka, S., Boveris, A., Gelpi, R. J., Brusco, A., & Poderoso, J. J. (2017). Characterization of Tunneling Nanotubes in Wharton's jelly Mesenchymal Stem Cells. An Intercellular Exchange of Components between Neighboring Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(4). <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9730-8>
- Schiller, C., Huber, J. E., Diakopoulos, K. N., & Weiss, E. H. (2013). Tunneling nanotubes enable intercellular transfer of MHC class I molecules. *Human Immunology*, 74(4). <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.11.026>
- Shen, X., Pan, B., Zhou, H., Liu, L., Lv, T., Zhu, J., Huang, X., & Tian, J. (2017). Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes is regulated by miRNA-1-2 via WNT signaling pathway. *Journal of Biomedical Science*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0337-9>
- Shum, L. C., White, N. S., Mills, B. N., De Mesy Bentley, K. L., & Eliseev, R. A. (2016). Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation. *Stem Cells and Development*, 25(2). <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0193>
- Sinclair, K. A., Yerkovich, S. T., Hopkins, P. M. A., & Chambers, D. C. (2016). Characterization of intercellular communication and mitochondrial donation by mesenchymal stromal cells derived from the human lung. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0354-8>
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G., & Chan, D. C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 20(15). <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-03-0252>
- Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J., & Prockop, D. J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.0510511103>

- Symersky, J., Osowski, D., Walters, D. E., & Mueller, D. M. (2012). Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1207912109>
- Tangtrongsup, S., & Kisiday, J. D. (2018). Modulating the oxidative environment during mesenchymal stem cells chondrogenesis with serum increases collagen accumulation in agarose culture. *Journal of Orthopaedic Research*, *36*(1). <https://doi.org/10.1002/jor.23618>
- Troncoso, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Nemchenko, A., Kawashima, Y., Del Campo, A., Toro, B., Battiprolu, P. K., Aranguiz, P., Chiong, M., Yakar, S., Gillette, T. G., Hill, J. A., Abel, E. D., Leroith, D., & Lavandero, S. (2012). Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy. *Cardiovascular Research*, *93*(2). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr321>
- van Buul, G. M., Villafuertes, E., Bos, P. K., Waarsing, J. H., Kops, N., Narcisi, R., Weinans, H., Verhaar, J. A. N., Bernsen, M. R., & van Osch, G. J. V. M. (2012). Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, *20*(10). <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.003>
- Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolte, J., Phinney, D. G., & Sensebe, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, *21*(10). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.002>
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., De Vries, R. L. A., Kim, J., May, J., Tocilescu, M. A., Liu, W., Ko, H. S., Magrané, J., Moore, D. J., Dawson, V. L., Grailhe, R., Dawson, T. M., Li, C., Tieu, K., & Przedborski, S. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.0911187107>
- Wang, C., Li, Y., Yang, M., Zou, Y., Liu, H., Liang, Z., Yin, Y., Niu, G., Yan, Z., & Zhang, B. (2018). Efficient Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Endothelial Cells in Vitro. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, *55*(2). <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2017.10.012>
- Wang, F., Zhang, S., Vuckovic, I., Jeon, R., Lerman, A., Folmes, C. D., Dzeja, P. P., & Herrmann, J. (2018). Glycolytic Stimulation Is Not a Requirement for M2 Macrophage Differentiation. *Cell Metabolism*, *28*(3). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.012>
- Wang, J., Liu, X., Qiu, Y., Shi, Y., Cai, J., Wang, B., Wei, X., Ke, Q., Sui, X., Wang, Y., Huang, Y., Li, H., Wang, T., Lin, R., Liu, Q., & Xiang, A. P. (2018). Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of Hematology and Oncology*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0554-z>
- Wang, S., & Gu, K. (2018). Insulin-like growth factor 1 inhibits autophagy of human colorectal carcinoma drug-resistant cells via the protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, *17*(2). <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8272>
- Wang, S., Wang, Z., Su, H., Chen, F., Ma, M., Yu, W., Ye, G., Cen, S., Mi, R., Wu, X., Deng, W., Feng, P., Zeng, C., Shen, H., & Wu, Y. (2021). Effects of long-term culture on the biological characteristics and RNA profiles of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, *26*. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.013>

- Wang, W., Zhang, Y., Lu, W., & Liu, K. (2015). Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120629>
- Wobma, H. M., Kanai, M., Ma, S. P., Shih, Y., Li, H. W., Duran-Struuck, R., Winchester, R., Goeta, S., Brown, L. M., & Vunjak-Novakovic, G. (2018). Dual IFN- γ /hypoxia priming enhances immunosuppression of mesenchymal stromal cells through regulatory proteins and metabolic mechanisms. *Journal of Immunology and Regenerative Medicine*, *1*. <https://doi.org/10.1016/j.regen.2018.01.001>
- Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z., & Xing, D. (2011). Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS Journal*, *278*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08010.x>
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., & Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, *98*(1). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
- Xia, L., Zhang, C., Lv, N., Liang, Z., Ma, T., Cheng, H., Xia, Y., & Shi, L. (2022). AdMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages. *Theranostics*, *12*(6). <https://doi.org/10.7150/thno.69533>
- Yang, M., Teng, S., Ma, C., Yu, Y., Wang, P., & Yi, C. (2018). Ascorbic acid inhibits senescence in mesenchymal stem cells through ROS and AKT/mTOR signaling. *Cytotechnology*, *70*(5). <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0220-x>
- Yang, Y. H. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T. Y., & Barabino, G. A. (2018). Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0876-3>
- Yang, Y., Ye, G., Zhang, Y. L., He, H. W., Yu, B. Q., Hong, Y. M., You, W., & Li, X. (2020). Transfer of mitochondria from mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells attenuates hypoxia-ischemia-induced mitochondrial dysfunction in PC12 cells. *Neural Regeneration Research*, *15*(3). <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266058>
- Ye, G., Xie, Z., Zeng, H., Wang, P., Li, J., Zheng, G., Wang, S., Cao, Q., Li, M., Liu, W., Cen, S., Li, Z., Wu, Y., Ye, Z., & Shen, H. (2020). Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction facilitates mesenchymal stem cell senescence in ankylosing spondylitis. *Cell Death and Disease*, *11*(9). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02993-x>
- Yu, S. H., Kim, S., Kim, Y., Lee, S. E., Park, J. H., Cho, G., Ha, J. C., Jung, H., Lim, S. M., Han, K., Lee, H. K., Kang, Y. C., & Kim, C. H. (2022). Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived mitochondria (PN-101) attenuate LPS-induced inflammatory responses by inhibiting NF κ B signaling pathway. *BMB Reports*, *55*(3). <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2022.55.3.083>
- Yuan, Y., Yuan, L., Li, L., Liu, F., Liu, J., Chen, Y., Cheng, J., & Lu, Y. (2021). Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells to macrophages restricts inflammation and alleviates kidney injury in diabetic nephropathy mice via PGC-1 α activation. *Stem Cells*, *39*(7). <https://doi.org/10.1002/stem.3375>
- Zhang, W., Hou, W., Chen, M., Chen, E., Xue, D., Ye, C., Li, W., & Pan, Z. (2020). Upregulation of Parkin Accelerates Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration by Enhancing Autophagy and β -Catenin Signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576104>

Zhang, Y., Marsboom, G., Toth, P. T., & Rehman, J. (2013). Mitochondrial Respiration Regulates Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077077>

Zhang, Y., Yu, Z., Jiang, D., Liang, X., Liao, S., Zhang, Z., Yue, W., Li, X., Chiu, S. M., Chai, Y. H., Liang, Y., Chow, Y., Han, S., Xu, A., Tse, H. F., & Lian, Q. (2016). iPSC-MSCs with High Intrinsic MIRO1 and Sensitivity to TNF- α Yield Efficacious Mitochondrial Transfer to Rescue Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. *Stem Cell Reports*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.009>

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2). <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>

*review jsou označeny hvězdičkou

Další použité zdroje:

<https://clinicaltrials.gov>

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/alofisel>