

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Barbora Džuganová**

Protinádorové pôsobenie mezenchymálnych kmeňových buniek  
Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Magdaléna Krulová, PhD.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 8. 1. 2018

.....

**Pod'akovanie:**

Rada by som pod'akovala mojej školiteľke RNDr. Magdaléne Krulovej, PhD. za venovaný čas, ochotu, ústretovosť a odborné vedenie pri vypracovaní mojej bakalárskej práce. Pod'akovanie patrí taktiež mojej rodine, ktorá ma počas celého môjho štúdia podporovala.

## **Abstrakt**

Mezenchymálne kmeňové bunky (mesenchymal stem cells, MSCs) sú multipotentné a majú schopnosť migrácie do miesta zápalu aj do nádorových miest. Dokážu regenerovať poškodené tkanivá, sú ľahko izolovateľné a kultivovateľné. Ďalej môžu inhibovať nádorové bunky a modulovať imunitnú odpoveď. V organizme pôsobia netoxicky a genetická modifikácia dokáže zosilniť ich protinádorový účinok. MSCs môžu slúžiť aj ako vektor pre doručenie terapeutickkej látky k nádoru. Práve tieto vlastnosti z nich robia sľubný prostriedok pre protinádorovú terapiu. Za niektorých podmienok môžu však rast nádoru aj podporovať. Táto práca sa preto zaoberá podmienkami, pri ktorých MSCs inhibujú rast rakovinových buniek, pretože doteraz nie je úplne jasné na akých presných mechanizmoch je táto inhibícia založená.

### **Kľúčové slová:**

mezenchymálne kmeňové bunky, nádory, inhibícia, regenerácia, terapia

## **Abstract**

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells with the ability to migrate to inflammation sites and to tumor sites. They are able to regenerate the damaged tissues and also easy to isolate and cultivate. Furthermore, they can inhibit tumor cells and modulate the immune response. They are non-toxic in the organism and genetic modification of them can enhance their antitumor effect. MSCs can also serve as a vehicle for delivery of the therapeutic agent to the tumor. These properties make them special for anti-tumor therapy. Under some conditions, MSCs can also stimulate the tumor growth. This work discusses conditions in which MSCs inhibit the growth of cancer cells, as it is not yet clear on which precise mechanisms this inhibition is based.

### **Keywords:**

mesenchymal stem cells, tumor, inhibition, regeneration, therapy

## Zoznam skratiek:

bFGF	basic fibroblast growth factor, základný fibroblastový rastový faktor
CD	cluster of differentiation, diferenciačný antigén
DAMP	danger associated molecular patterns, s nebezpečím asociované molekulárne vzory
5-FC	5-fluorocytozín
GCV	ganciklovír
GVHD	graft vs. host disease, reakcia štepu proti hostiteľovi
H&E	farbenie hematoxilínom a eosínom
HDGF	hepatoma-derived growth factor, rastový faktor odvodený z hepatómu
HLA	human leucocyte antigen, hlavný histokompatibilný systém
HSV-TK	tymidín kináza vírusu herpes simplex
hMSCs	human mesenchymal stem cells, ľudské MSCs
hMSCs-LIGHT	hMSCs transdukované k prenosu LIGHT
hMSCs-PTX	hMSCs po expozícii PTX
hUCBSC	human umbilical cord blood stem cells, MSCs odvodené z ľudskej pupočníkovej krvi
hWJSC-CM	human Wharton's jelly stem cells conditioned medium, koncentrát ľudských kmeňových buniek Whartonovho rôsolu
IFN	interferón
IL	interleukín
KS	Kaposiho sarkóm
MCP-2	monocyte chemoattractant protein-2, monocytový chemoatraktantový proteín-2

MHC-I	major histocompatibility complex class I, hlavný histokompatibilný komplex I. triedy
MHC-II	major histocompatibility complex class II, hlavný histokompatibilný komplex II. triedy
MSCs	mesenchymal stem cells, mezenchymálne kmeňové bunky
MSCs-IL-2	MSCs transdukované tak, že produkujú interleukín 2
MSCs-INF- $\beta$ -bunky	MSCs transdukované tak, že produkujú interferón $\beta$
MSCs-PEDF	MSCs adenovirálné transdukované k produkcii PEDF
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B, nukleárny faktor $\kappa$ B
NHL	non-Hodgkinov lymfóm
NK	natural killers, prirodzení zabíjači
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma, pankreatický adenoduktálny karcinóm
PDGF	platelet derived growth factor, rastový faktor odvodený z krvných doštičiek
PDGFR	platelet derived growth factor receptor, receptor pre rastový faktor odvodený z krvných doštičiek
PEDF	pigment epithelium-derived factor, faktor odvodený z pigmentového epitelu
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase, fosfatidyl-inozitol-3-kináza
Pten	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, fosfatázový a tenzínový homológ deletovaný na chromozóme 10
PTX	paklitaxel
ROS	reactive oxygens species, reaktívne kyslíkové druhy
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$ , tumor nekrotizujúci faktor- $\alpha$
TNFSF14 (LIGHT)	tumor necrosis factor superfamily member 14 (LIGHT), tumor nekrotizujúci faktor z nadrodiny 14 (LIGHT)

TRIAL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, apoptózu indukujúci ligand zo skupiny tumor nekrotizujúcich faktorov
UPA	urokinase-type plasminogen activator, aktivátor plazminogénu urokinázového typu
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, adhézna molekula 1 vaskulárnych buniek
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulárny endotelový rastový faktor
yCD-UPRF	kvasinková cytozín-deamináza::uracilfosforibozyltransferáza
yCD-UPRF-AD-MSA/5-FU	system adenovírom transdukovaných MSCs exprimujúcich yCD-UPRF v kombinácii s 5-fluorocytosínom
xGli36	kultúra ľudských gliómových buniek

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Mezenchymálne kmeňové bunky</b> .....	<b>1</b>
2.1. Migrácia do nádorového tkaniva .....	3
2.2. Protinádorový účinok MSCs .....	5
<b>3. Mechanizmy účinku potlačenia nádorového rastu pomocou MSCs</b> .....	<b>6</b>
3.1. Intracelulárna signalizácia .....	6
3.2. Vylučovanie rozpustných faktorov a potlačenie signalizácie dráhy Wnt a Akt .....	7
3.2.1. Inhibícia rastu a migrácie rakovinových buniek .....	8
3.2.2. Inhibícia angiogenézy a produkcia ROS .....	9
3.2.2.1. Downregulácia osí PDGF/PDGFR .....	10
3.3. Zastavenie bunčného cyklu nádorových buniek vo fáze G0/G1 .....	11
<b>4. Geneticky modifikované MSCs</b> .....	<b>12</b>
4.1. MSCs ako vektor rôznych terapeutík .....	12
4.1.1. MSCs ako vektor interferónov .....	12
4.1.2. MSCs ako vektor IL-2 .....	12
4.1.3. MSCs ako vektor pre TRIAL .....	13
4.1.4. MSCs ako vektor PEDF .....	13
4.1.5. MSCs ako vektor NK4 .....	13
4.2. MSCs ako nosič retrovírusových vektorov .....	14
4.3. MSCs ako vektorov chaperonov onkolytických adenovírusov .....	14
<b>5. Príklady terapeutického využitia MSCs v protinádorovej terapii</b> .....	<b>14</b>
5.1. Pôsobenie MSCs obsahujúcich paklitaxel na pľúcne metastázy .....	15
5.2. Tepelne ošetrované MSCs v modeli ľudského ovariálneho adenokarcinómu .....	16
5.3. Koncentrát ľudských kmeňových buniek Whartonovho rôsolu .....	17
5.4. hMSCs ako nosič LIGHT v protinádorovej terapii rakoviny žalúdka .....	17
5.5. hMSCs transdukované k vylučovaniu $\gamma$ CD-UPRF .....	17
5.6. Protinádorový vplyv hMSCs na Non-Hodgkinov lymfóm .....	18
5.7. hMSCs ako vektor HSV-TK v kombinácii s ganciklovírom .....	20
5.8. Podporná liečba pomocou hMSCs .....	20
<b>6. Záver</b> .....	<b>20</b>
<b>Zoznam použitej literatúry</b> .....	<b>22</b>

## 1. Úvod

Mezenchymálne kmeňové bunky (MSCs – mesenchymal stem cells) sú multipotentné, nehematopoetické, progenitorové bunky, ktoré je možné izolovať z rôznych typov tkanív ako je kostná dreň, tukové tkanivo alebo placenta. Medzi ich schopnosti patrí diferenciácia do viacerých bunčných línií, napríklad premena v adipocyty, osteocyty, chondrocyty, svalové bunky, ale aj bunky stromálne. MSCs sú tiež schopné podporovať hematopoézu a modulovať imunitnú odpoveď (Uchibori *et al.* 2014). Dokážu lokalizovať a migrovať do poraneného alebo zapáleného tkaniva vrátane nádorov. Sú schopné regenerovať poškodené tkanivo pomocou diferenciácie, ale aj parakrinnej signalizácie (Anthony *et al.* 2013). MSCs majú nízku úroveň imunogenicity, pretože exprimujú len málo kostimulačných molekúl MHC I a žiadne MHC II (Nauta *et al.* 2007). Kvôli tomu MSCs neaktivujú imunitnú odpoveď príjemcu a taktiež unikajú imunologickému odmietnutiu po ich podaní HLA – neidentickým príjemcom.

Pozoruhodné je, že aj keď sú MSCs imunosupresívne, môžu mať protinádorové imunitné účinky. MSCs sú v posledných rokoch rôzne skúmané a skúmajú sa aj ich účinky na nádory. Do súčasnosti platí, že nebol zistený toxický účinok MSCs pre organizmus. MSCs by mohli byť sľubným nástrojom v protinádorovej terapii, lebo pôsobia na bunky nádoru inhibične. MSCs môžu byť geneticky modifikované tak, aby pôsobili protinádorovo.

Protichodné štúdie ukázali, že MSCs môžu tiež podporovať rast nádorových buniek. Na to, ako budú reagovať MSCs v nádore, má vplyv viacero faktorov. Jedným z nich môže byť načasovanie podania MSCs do nádoru, ale to za akých podmienok MSCs pôsobia na nádor inhibične alebo stimulačne, je stále predmetom skúmania. Práve porozumenie podmienkam, v ktorých budú MSCs inhibovať nádorové bunky je zásadné a potrebné k rozvoju prípadnej protinádorovej terapie.

Cieľom tejto práce je zhrnúť poznatky o protinádorovej terapii pomocou MSCs a objasniť, akými rôznymi mechanizmami pomáhajú potláčať rast nádorov. Ďalej by som sa chcela zaoberať tým, akú úlohu hrajú MSCs v protinádorovej terapii a v inhibícii rakovinových buniek.

## 2. Mezenchymálne kmeňové bunky

MSCs sú charakterizované podľa troch kritérií. Najskôr musia byť MSCs adherentné k plastu pri kultivácii za štandardných podmienok. Druhým kritériom je expresia povrchových markerov (cluster of differentiation, CD) CD105, CD73, CD90 a naopak neexprimovanie

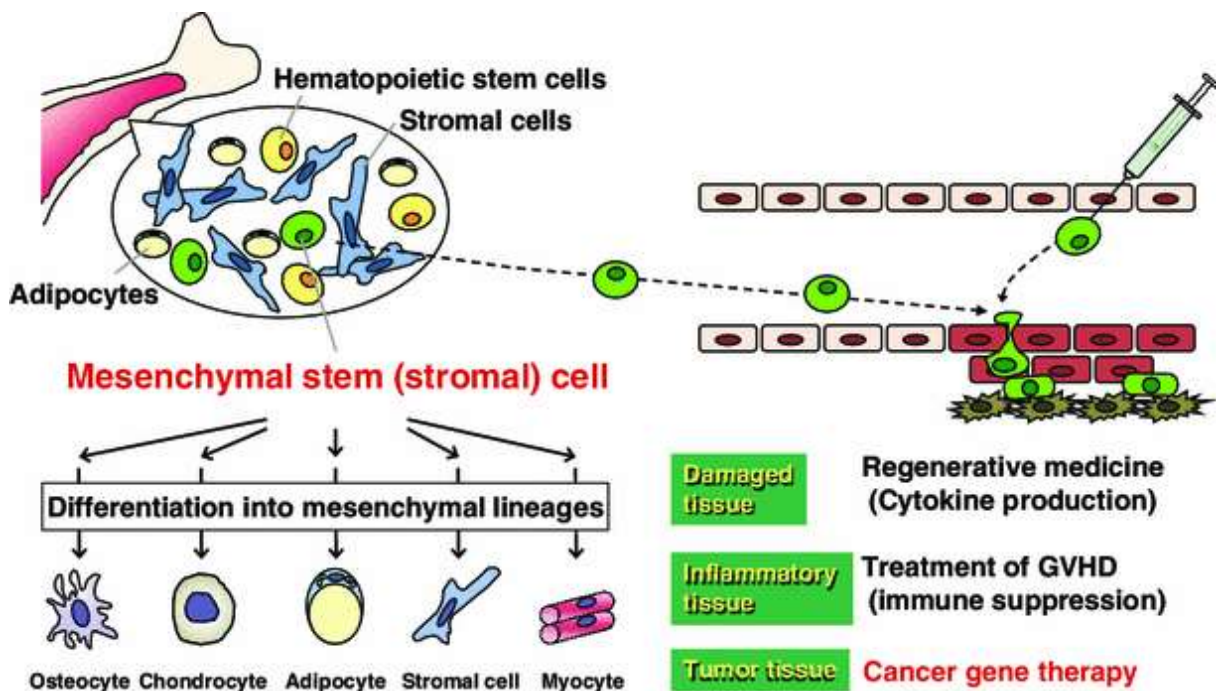
CD45, CD34, CD14 a ďalších typických hematopoetických markerov. Po tretie, MSCs sa musia diferencovať na osteoblasty, adipocyty a chondroblasty, čiže musia byť multipotentné (Dominici *et al.* 2006).

Na základe expresie vyššie uvedených znakov sa podarilo izolovať MSCs z rôznych ľudských tkanív vrátane kostnej drene (Barry *et al.* 2004), tukového tkaniva (Zuk *et al.* 2001), periférnej krvi (Zvaifer *et al.* 2000), pupočníkovej krvi (Erices *et al.* 2000), plodovej vody (Tsai *et al.* 2004), chrupavky (Alsalameh *et al.* 2004) a synoviálneho tkaniva (De Bari *et al.* 2001). MSCs boli charakterizované aj v menštruačnej krvi (Meng *et al.* 2007). MSCs odvodené z ľudskej pupočnej šnúry (human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUCBSC) sú považované za alternatívny zdroj buniek pre bunecnú terapiu kvôli ich hematopoetickému a mezenchymálnemu potenciálu (Markov *et al.* 2007). Mezenchymálne kmeňové bunky odvodené z pupočníkovej krvi vykazujú vyšší proliferačný a expanzívny potenciál než dospelé MSCs derivované z kostnej drene (Wang *et al.* 1997). Whartonov rôsol, ako bunky spojivového tkaniva v pupočnej šnúre, sa tiež podarilo charakterizovať ako MSCs (Troyer *et al.* Weiss 2008). Bunky Whartonovho rôsolu disponujú hypoimunogénnymi a antitumorogénnymi vlastnosťami (Bongso *et al.* Fong 2013). Kvôli antitumoregénnym vlastnostiam týchto buniek bol preukázaný aj nízky výskyt rakoviny u nenarodeného plodu, lebo rakovinové bunky môžu migrovať z matky na plod cez pupočnú šnúru (Yang *et al.* Chao 2013).

Ďalšími vlastnosťami MSCs sú hematopoetická podpora, imunoregulácia (Chen *et al.* 2006), multilíniová diferenciácia (Xie *et al.* 2013) a špecifická migrácia. Práve zvýšená koncentrácia chemokínov v mieste poranenia je dôležitou hnacou silou k tejto migrácii (Ponte *et al.* 2007). Medzi ostatné výhody patrí ich nízka imunogenicita, čo MSCs zatriktívňuje k využitiu v mnohých terapeutických liečbach rôznych ochorení (Si *et al.* 2011). MSCs sú schopné vytvoriť mikroprostredie, ktoré podporuje dlhodobú diferenciáciu hematopoetických kmeňových buniek. Taktiež hrajú dôležitú úlohu pri regenerácii tkanív, kedy dokážu napraviť poškodené tkanivo pri rôznych ochoreniach (Prockop 2009).

V posledných rokoch je taktiež veľmi lukratívne využívanie MSCs v regeneratívnej terapii, lebo dokážu migrovať do poškodených tkanív. Ich výhoda je hlavne v ľahkej izolácii, množení *ex vivo* a ich multipotenciálnej diferenciačnej schopnosti spolu s imunosupresívnymi vlastnosťami (Djouad *et al.* 2003). Tieto imunosupresívne vlastnosti sú založené na modulácii cytotoxických T buniek, antigén prezentujúcich buniek, prirodzených zabíjačov (natural killers, NK) a B buniek. Tento poznatok sa dá využiť v zabránení reakcie

štetu proti hostiteľovi (graft vs. host disease, GVHD) (Jones *et al.* 2008). Migrácia MSCs do miest nádorov by sa dala použiť v nádorovej gémovej terapii, ale toto využitie je stále v štádiu skúmania (Uchibori *et al.* 2014) (obrázok 1).



**obrázok 1**

Mezenchymálne kmeňové bunky (MSCs) izolované z kostnej drene, sú multipotentné bunky – diferencujú sa na osteocyty, chondrocyty, adipocyty, stromálne bunky a myocyty. Migrujú do poškodeného tkaniva, kde majú regeneračné schopnosti produkciou cytokínov do miesta zápalu, kde pôsobia imunosupresívne, čo sa využíva pri terapii proti reakcii štetu voči hostiteľovi (GVHD) a do nádorového tkaniva, čo by sa dalo využiť v protinádorovej terapii (prevzaté z Uchibori *et al.* 2014).

## 2.1. Migrácia do nádorového tkaniva

MSCs dokážu špecificky migrovať do nádorového tkaniva, čo viedlo k veľkému záujmu o to, akú úlohu tam tieto bunky hrajú. Schopnosť lokalizácie a migrácie MSCs špecificky do nádorového tkaniva sa dá využiť k transportu protinádorových činidiel (Studený *et al.* 2002).

O tom, prečo sa MSCs hromadia v nádorovom tkanive sa stále veľa nevie. Pravdepodobne za migráciu MSCs do nádorového tkaniva môže viac faktorov dohromady (obrázok 2), ale veľmi silným faktorom sú práve zápalové reakcie, ktoré nádor sprevádzajú (Lee *et al.* 2017). Inhibícia jedného z faktorov môže byť efektívna, ale nie dostatočujúca pre kompletne zastavenie migrácie MSCs do nádorového tkaniva (Spaeth *et al.* 2011).

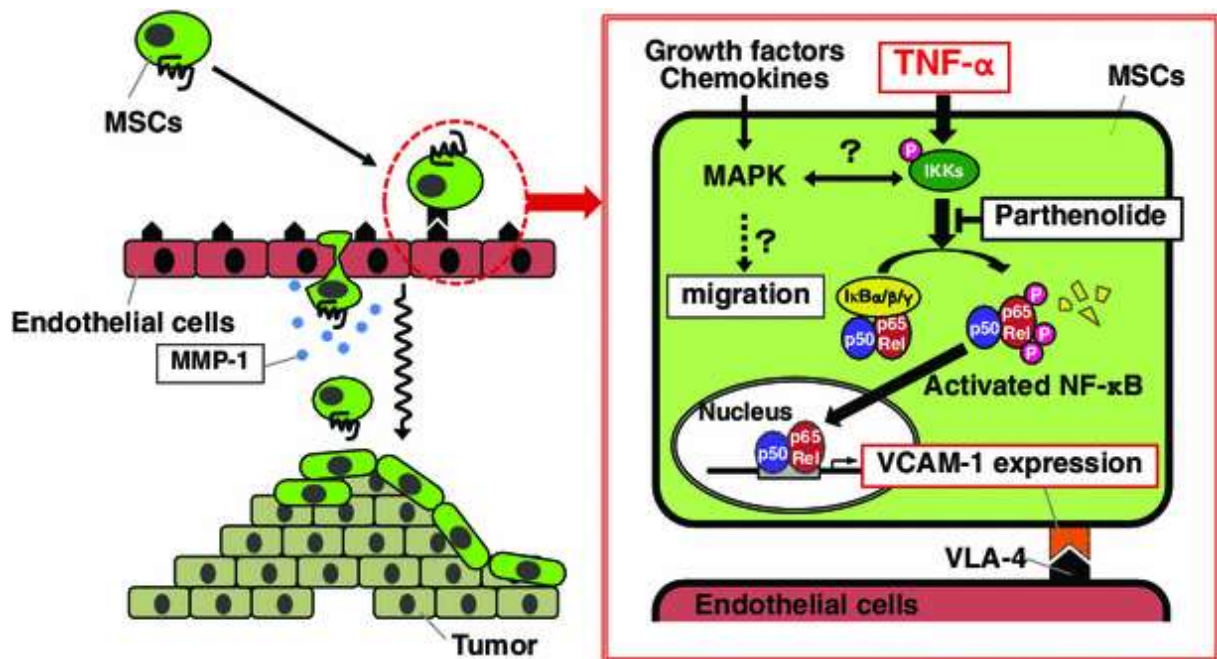


**obrázok 2**

Rôzne faktory sú zodpovedné za tropizmus mezenchymálnych kmeňových buniek (MSCs) smerom k nádorovým miestam. Patrí sem napríklad základný fibroblastový rastový faktor (basic fibroblast growth factor, bFGF), rastový faktor odvodený z hepatómu (hepatoma-derived growth factor, HDGF), interleukín 6 (IL-6), monocytový chemoatraktantový proteín – 2 (monocyte chemoattractant protein-2, MCP-2), aktivátor plazminogénu urokinázového typu (urokinase-type plasminogen activator, UPA) a vaskulárny endotelový rastový faktor (vascular endothelial growth factor, VEGF). Všetky tieto faktory sa podieľajú na migračnej kapacite MSCs voči nádorovým xenotransplantátom (prevzaté z Lee *et al.* 2017).

Ak by bolo možné zvýšiť akumuláciu MSCs na nádorových miestach, mohli by sa MSCs efektívne zamerať nielen na primárne nádory, ale aj metastázy. MSCs dokážu mobilizovať do poškodených tkanív, ako sú poranenia a zápaly, vďaka uvoľneným zápalovým cytokínom. Tumory sú vlastne miesta, obsahujúce veľké množstvo zápalových buniek (Tille *et Pepper* 2002). Preto pri použití tejto terapie by sa malo zvážiť vylúčenie pacientov po operácii alebo invazívnej procedúre alebo s infekciou (Studený *et al.* 2004).

Systémovo injektované MSCs sa môžu akumulovať v nádorových miestach, ale pri podaní MSCs subkutánne nie. Štúdie ukázali, že mechanizmus migrácie MSCs nemôže byť výhradne sprostredkovaný len pomocou cytokínov. Je možné, že aktivita nukleárneho faktoru  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) reguluje akumuláciu MSCs v tumoroch indukciou expresie adhéznej molekuly 1 vaskulárnych buniek (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1), ale aj následnú bunečnú interakciu s endotelovými bunkami nádorových ciev (Uchibori *et al.* 2014) (obrázok 3).



obrázok 3

Mechanizmus akumulácie mezenchymálnych kmeňových buniek (MSCs) v tumoroch – rastové faktory a chemokíny priťahujú MSCs do nádorového tkaniva. Zápalové cytokíny ako je tumor nekrotizujúci faktor- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) stimulujú MSCs a indukujú expresiu adhézneho molekuly 1 vaskulárnych buniek (VCAM-1). Aktivované MSCs atakujú tumorové cievy, penetrujú ich a akumulujú sa v nádorových miestach (prevzaté z Uchibori *et al.* 2014).

## 2.2. Protinádorový účinok MSCs

MSCs dokážu pôsobiť protinádorovo pomocou rôznych mechanizmov účinku na nádorové bunky. Viaceré tieto mechanizmy nie sú doteraz známe, a preto sú stále predmetom rôznych štúdií. Bolo dokázané, že MSCs môžu sprostredkovať protinádorový účinok:

- intracelulárnou signalizáciou navodenou interakciou s povrchovými molekulami nádorových buniek (Khakoo *et al.* 2006; Ho *et al.* 2012; Uchibori *et al.* 2014)
- vylučovaním rozpustných faktorov (Molloy *et al.* 2009)
- potlačením signalizácie Akt a Wnt (Khakoo *et al.* 2006; Qiao *et al.* 2008a; Qiao *et al.* 2008b; Rhee *et al.* 2015)
- inhibíciou migrácie a invázie nádorových buniek (Dasari *et al.* 2000)
- inhibíciou angiogenézy (Rhee *et al.* 2015)
- produkciou reaktívnych kyslíkových druhov (reactive oxygen species, ROS) (Otsu *et al.* 2009)

- downreguláciou osi rastový faktor odvođený z krvných doštičiek (platelet derived growth factor, PDGF)/ receptor pre PDGF (PDGF receptor, PDGFR) (Ho *et al.* 2013)
- zastavením bunecného cyklu nádorových buniek vo fáze G0/G1 (Ramasamy *et al.* 2007; Cousin *et al.* 2009)

MSCs sa tiež dajú geneticky modifikovať tak, aby sa z nich stali nosiče rôznych protinádorových terapeutík a aby sa zosilnil ich protinádorový účinok. K modifikácii MSCs sa najčastejšie používa technika vkladania génu, pre ktorú je potrebný určitý vektor, najčastejšie boli použité špeciálne upravené vírusy. Doteraz boli študované nasledujúce genetické modifikácie MSCs tak, aby mali protinádorové účinky:

- MSCs ako vektor rôznych terapeutík (Pessina *et al.* 2015)
- MSCs ako vektor interferónov (IFN) (Studený *et al.* 2004)
- MSCs ako vektor interleukínu 2 (IL-2) (Hamada *et al.* 2005)
- MSCs ako vektor apoptózu indukujúceho ligandu zo skupiny tumor nekrotizujúcich faktorov (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) (Wang *et al.* 2017)
- MSCs ako vektor faktoru odvođeného od pigmentového epitelu (pigment epithelium-derived factor, PEDF) (Yang *et al.* 2016)
- MSCs ako vektor prirodzených zabíjačov 4 (natural killers 4, NK4) (Cai *et al.* 2017)
- MSCs ako nosič retrovírusových vektorov (Uchibori *et al.* 2014; Rincón *et al.* 2017)
- MSCs ako vektor chaperonov onkolytických adenovírusov (Komarova *et al.* 2006; Xia *et al.* 2011)

### **3. Mechanizmy účinku potlačenia nádorového rastu pomocou MSCs**

Ako bolo vyššie spomenuté, MSCs môžu pôsobiť protinádorovo pomocou viacerých mechanizmov, ktoré už boli preskúvané, ale aj také, ktoré sú stále predmetom skúmania. Protinádorovo môžu pôsobiť rôzne druhy MSCs aj tie, ktoré sú k tomu špeciálne geneticky modifikované. V ďalších podkapitolách budú jednotlivé mechanizmy rozobraté viac do hĺbky.

#### **3.1. Intracelulárna signalizácia**

MSCs môžu pôsobiť priamym účinkom na susedné bunky prostredníctvom intercelulárnych signalizácií, ktoré sú navodené interakciou s povrchovými molekulami nádorových buniek, stromálnych fibroblastov, imunitných buniek, červených krviniek alebo lymfatických buniek, ktoré nakoniec určujú osud kinetiky rastu nádoru

(Ho *et al.* 2013). Terapia by mohla znížiť systémové vedľajšie účinky tým, že protinádorové činidlá by sa podali pomocou MSCs a tým by sa zvýšila ich koncentrácia len v mieste nádorového tkaniva, pričom sa nezvýši v celom organizme (Uchibori *et al.* 2014). Tu je vidieť, že MSCs nie sú len vektorom antinádorových látok k nádoru, ako je spomínané v kapitole 2.1., ale dokážu aj naakumulovať antinádorové činidlá v nádore.

Štúdie ukázali, že ľudské MSCs (human MSCs, hMSCs) pochádzajúce z kostnej drene, vykazujú v Kaposiho sarkóme (KS) silné protinádorové účinky. Tieto účinky sú sprostredkované priamym bunecným kontaktom, čo viedlo k inhibícii aktivácie Akt v bunkách KS (Khakoo *et al.* 2006).

### **3.2. Vylučovanie rozpustných faktorov a potlačenie signalizácie dráhy Wnt a Akt**

K inhibícii rakovinových buniek môže dochádzať aj bez bunecného kontaktu pomocou Dkk-1 proteínu, ktorý je sekretovaný hMSCs. Dkk-1 potlačuje aktivitu Wnt dráhy, a tým dochádza k inhibícii proliferácie rakovinových buniek (Qiao *et al.* 2008a). Na základe tohto mechanizmu pravdepodobne prebieha inhibícia primárnych buniek spôsobujúcich leukémiu, pomocou hMSCs derivovaných z tukového tkaniva (Zhu *et al.* 2009). Predpokladá sa, že signálna dráha Wnt môže regulovať inhibičnú aktivitu hMSCs. Pomocou signálnej dráhy Wnt/ $\beta$ -catenin by sa dala vytvoriť protinádorová terapia, ktorá by využívala hMSCs (Qiao *et al.* 2008a). Pri skúmaní inhibičného účinku hMSCs na rast rakovinových buniek prsníka bolo pozorované, že na downregulácii  $\beta$ -cateninu sa tiež podieľa Dkk-1 proteín (Qiao *et al.* 2008b). Bol skúmaný aj účinok hMSCs na bunky ľudského hepatómu v myšom modele. Výsledky ukázali, že latentný čas vzniku hepatómu sa predĺžil a jeho veľkosť bola menšia oproti kontrolám bez podania hMSCs. Skúmal sa tiež efekt hMSCs na bunky hepatómu pri ich spoločnej kultivácii *in vivo* a ukázalo sa, že tieto hepatómy boli menšie, proliferácia hepatomálnych buniek bola nižšia, a naopak rýchlosť apoptózy sa zvýšila. Pri tejto spoločnej kultivácii dokonca došlo k downregulácii expresie proteínov hepatómu ako je svorkový proteín, Bcl-2, survivín a c-Myc, čo dokazuje, že hMSCs sú schopné inhibície nádorových buniek. Okrem tejto downregulácie bolo zistené, že aj hladina  $\beta$ -cateninu sa znížila pôsobením hMSCs (Qiao *et al.* 2008a).

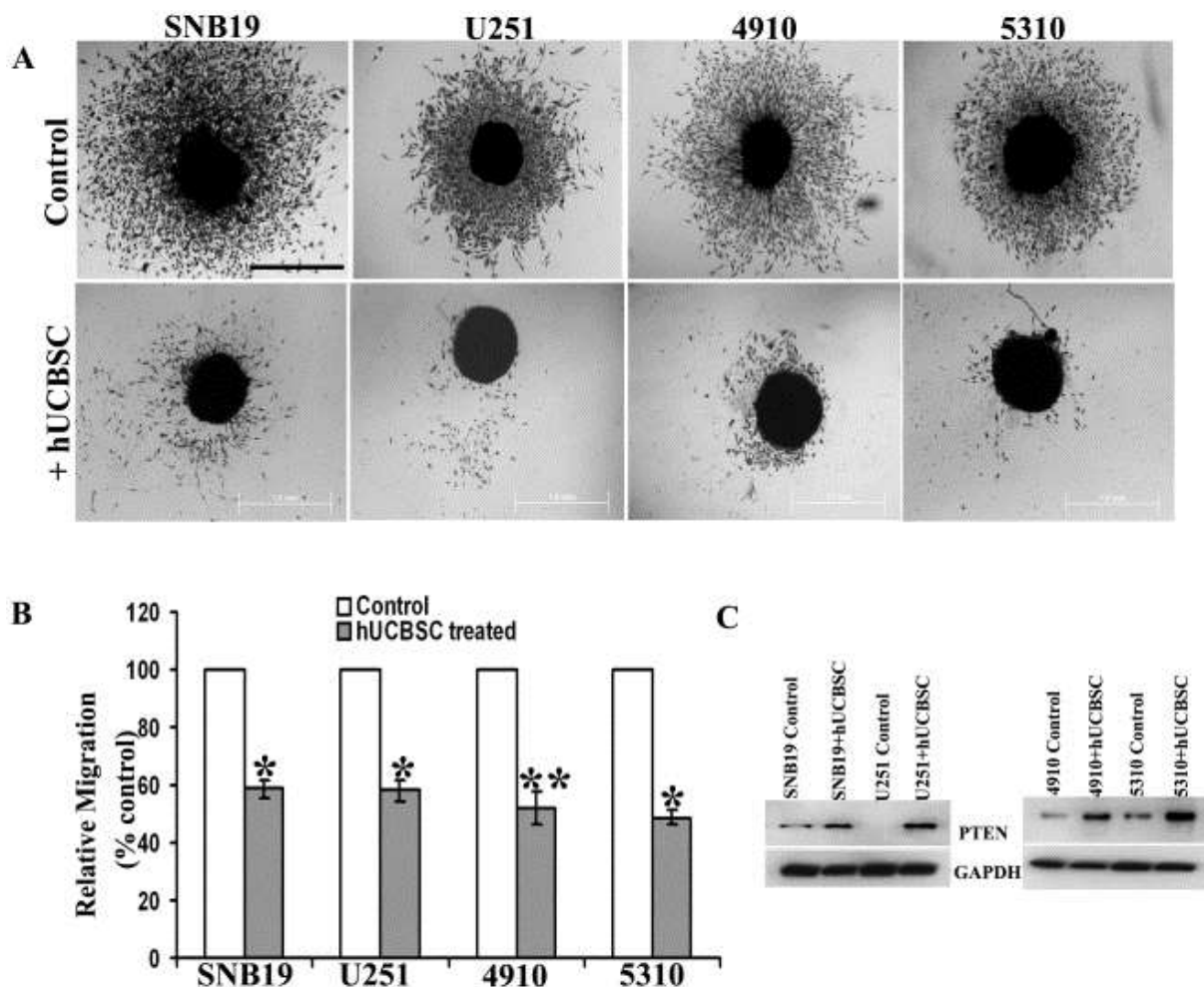
MSCs vylučujú niekoľko cytokínov, ktoré majú v nádorovom prostredí parakrinné aj autokrinné funkcie. Medzi tieto funkcie patrí potlačenie lokálnej imunitnej odpovede, inhibícia fibrózy a apoptózy, modulácia angiogenézy, stimulácia mitózy a diferenciácie buniek (Caplan *et al.* 2006). Pri kultivácii hMSCs s bunkami rakoviny prsníka, hMSCs vylučujú

mnoho faktorov zahrňujúcich chemokínový ligand 2 s chemokínovým motívom C-C, IL-6 a tkanivový inhibítor metaloproteinázy 1, ktoré obmedzujú rast rakovinových buniek (Molloy *et al.* 2009).

### **3.2.1. Inhibícia rastu a migrácie nádorových buniek**

MSCs pôsobia protinádorovo prostredníctvom inhibície migrácie a invázie nádorových buniek. Takže protinádorový a antimetastatický účinok MSCs hrá úlohu v rozvoji nádoru, pričom celkový výsledok závisí na sekrečnej rovnováhe nádorových a protinádorových molekúl (Clarke *et al.* 2015).

Boli vykonané štúdie, v ktorých sa zisťovalo pôsobenie hUCBSC na účinky migrácie buniek gliómu zvýšením expresie nádorového supresorového génu fosfatázového a tenzínového homológu deletovaného na chromozóme 10 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, Pten). Pten je hlavným regulátorom signálnej dráhy fosfatidyl-inozitol-3-kináza (phosphatidyl-inositol-3-kinase, PI3K)/Akt. hUCBSC sú schopné upregulovať Pten a súčasne downregulovať PI3K/Akt, čím dochádza k inhibícii rastu a migrácie rakovinových buniek (obrázok 4). Zameranie sa na Pten použitím hUCBSC môže byť novou stratégiou pre molekulárnu terapiu nádorových ochorení (Dasari *et al.* 2010).



obrázok 4

Mezenchymálne kmeňové bunky odvodené z ľudskej pupočnej šnúry (hUCBSC) kultivované s bunkami gliómu dokážu inhibovať migráciu sféroidov (SNB19, U251, 4910, 5310). Sféroídny model je trojrozmerný systém bunkovej kultúry, ktorý pripomína *in vivo* situáciu nádoru. Rast sféroidov odráža proliferáciu nádorových buniek, zatiaľ čo migračný test meria schopnosť týchto buniek migrovať a proliferovať. V časti A môžeme vidieť bunky zo sféroidov a bunky ošetrené pomocou hUCBSC, ktoré boli kultivované po dobu 48 hodín. Na obrázkoch môžeme vidieť, že bunky ošetrené pomocou hUCBSC migrovali menej oproti kontrolám. Časť B ukazuje, že migrácia sféroidov bola signifikantne inhibovaná po podaní hUCBSC oproti kontrolám. Časť C ukazuje, že sféroídy v kombinácii s hUCBSC vykazovali zvýšenú expriáciu nádorového supresorového génu fosfatázového a tenzínového homológu deletovaného na chromozóme 10 (Pten) oproti kontrolám. Upregulácia Pten v gliómových bunkách z kondicionovaného média kultivovaného gliómu a hUCBSC, inhibuje migráciu sféroidov (prevzaté z Dasari *et al.* 2010).

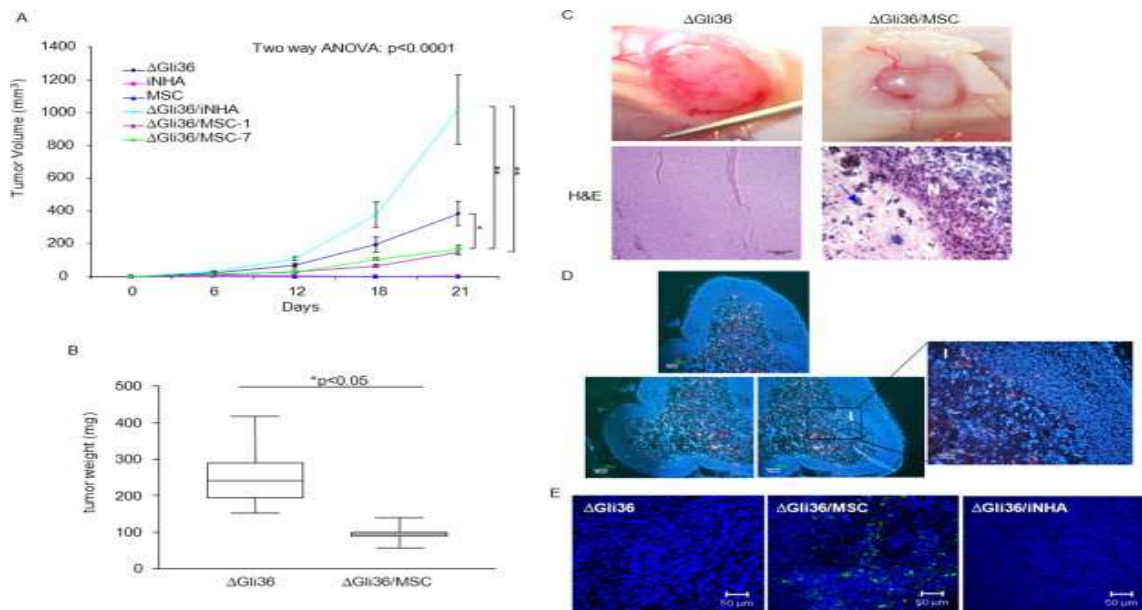
### 3.2.2. Inhibícia angiogenézy a produkcia ROS

MSCs dokážu inhibovať progresiu nádorov potlačením angiogenézy, ale aj vyvolaním apoptózy (Rhee *et al.* 2015). Toto zistenie bolo viditeľné na modele melanómu, v ktorom bola inhibovaná tvorba neokapilárnej siete pomocou MSCs získanými z kostnej drene a aplikovanými priamo do nádoru *in vivo*. Priama injekcia MSCs do nádoru spôsobí jeho regresiu apoptózou buniek kapilár. Po migrácii MSCs ku kapiláram melanómu tvorenými

endotelovými bunkami, MSCs vytvorili štrbinové spojenia s endotelovými bunkami kapilár a zvýšili produkciu ROS, ktoré sa podieľajú na apoptóze buniek kapilár. Protichodné štúdie uvádzajú, že MSCs dokážu aj podporiť rast nádorov pomocou zvýšenia angiogenézy nádorových kapilár (Otsu *et al.* 2009).

### **3.2.2.1. Downregulácia osi PDGF/PDGFR**

MSCs majú schopnosť downregulovať os PDGF/PDGFR, ktorá hrá kľúčovú úlohu pri angiogenéze gliómu, čím dochádza k inhibícii rastu primárnych gliómových buniek. Tento angiogénny účinok bol sprostredkovaný vylučovaním rozpustných faktorov, ktoré inhibujú rast endoteliálnych pregenitorových buniek a tým zhoršujú angiogenézu nádoru. V tejto štúdií bol použitý myší model. Je dôležité poznamenať, že MSCs sa nestali tumorogénnymi a u týchto myší nebol detekovaný žiadny nádorový zhluk po injekčnom podaní MSCs v prítomnosti Matrigelu až 1 mesiac. Predpokladá sa, že špecifické interakcie medzi bunkami MSCs a bunkami ľudského gliómu (xGli36) indukujú apoptózu buniek gliómu (Ho *et al.* 2013) (obrázok 5).



**obrázok 5**

Na obrázku môžeme vidieť protinádorový účinok mezenchymálnych kmeňových buniek (MSCs) v kultúre buniek ľudského gliómu ( $\alpha$ Gli36) v kombinácii s MSCs *in vivo*. Graf A ukazuje objem nádoru v rôznych časových bodoch, kde  $\alpha$ Gli36 predstavujú gliómové bunky, iNHA sú usmrtené normálne ľudské astrocyty, MSC sú MSCs,  $\alpha$ Gli36/iNHA je kultúra gliómových buniek v kombinácii s iNHA,  $\alpha$ Gli36/MSC-1 a  $\alpha$ Gli36/MSC-7 sú kultúry gliómových buniek v kombinácii s rozdielnym pomerom MSCs. Graf B ukazuje hmotnosť medzi nádorom bez MSCs a nádorom po podaní MSCs. Z grafov je vidieť, že objemy a hmotnosti nádorov u myší injektovaných pomerom  $\alpha$ Gli36/MSCs boli výrazne nižšie než hodnoty u kontrolných zvierat. Tento jav bol pozorovaný u dvoch izolátov MSCs konzistentne. Dvojsmerná ANOVA ukázala, že rozdiel medzi šiestimi skupinami buniek bol štatisticky významný, ale medzi skupinami  $\alpha$ Gli36/MSC-1 a  $\alpha$ Gli36/MSC-7 nebol rozdiel v objeme nádorov štatisticky významný. V časti C môžeme vidieť, že po podaní MSCs bol nádor menej vaskularizovaný oproti kontrole. Na hematoxilínovom a eosinovom farbení (H&E) je vidieť obvodový okraj nádorových buniek, ktoré zahájili nekrózu po podaní MSCs. Analýza s použitím protilátok proti ssDNA ukázala, že oblasť apoptických buniek v kultúre  $\alpha$ Gli36/MSCs v časti E sa zhodovala s lokalizáciou MSCs označených pomocou karboxymethyl-Dil v časti D – vložka I. Je pravdepodobné, že prítomnosť MSCs spôsobuje smrť rakovinových buniek gliómu. Naopak, apoptóza nebola detekovaná v nádoroch kontrol (prevzaté z Ho *et al.* 2013).

### 3.3. Zastavenie bunecného cyklu nádorových buniek vo fáze G1/G0

MSCs môžu *in vitro* zastaviť progresiu bunecného cyklu nádorových buniek vo fáze G1 a znížiť ich apoptickú mieru (Ramasamy *et al.* 2007). MSCs inhibovali rakovinové bunky pankreatického adenoduktálneho karcinómu (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC), ktorý je charakteristický extrémne hustou dezplastickou infiltráciou. Táto choroba je veľmi agresívna a stále sa pre ňu nenašlo vhodné terapeutické riešenie. Skúmalo sa pôsobenie MSCs získaných z tukového tkaniva práve na tieto pankreatické nádorové bunky a bola demonštrovaná schopnosť MSCs redukovať rast týchto buniek a spôsobovať bunecnú smrť zastavením bunecného cyklu vo fáze G1. Práve toto zistenie by sa mohlo teoreticky použiť v budúcnosti pri terapii 85 % PDAC, ktoré nie sú operovateľné (Cousin *et al.* 2009).

## 4. Geneticky modifikované MSCs

MSCs reprezentujú hlavnú prekursorovú populáciu buniek nádorového stroma – nádorovo asociované fibroblasty, pericyty a endotelové bunky, čo z MSCs robí bunky ideálne pre prenos nádorovo zameranej terapie (Niess *et al.* 2016). MSCs boli transdukované génom IFN- $\beta$  a infúziou podané myšiemu modelu s melanómom. Táto terapia úspešne preukázala zmenšenie nádoru a dlhšie prežitie myši (Studený *et al.* 2002). Na základe tohto zistenia sa derivovali MSCs z rôznych tkanív, skúmal sa ich terapeutický účinok a ich schopnosť pôsobiť ako bunečné prenášače.

### 4.1. MSCs ako vektor rôznych terapeutík

Geneticky modifikované MSCs navrhnuté tak, aby produkovali terapeutické molekuly, ktoré dopravujú do miesta s nádorom, majú silný terapeutický potenciál. MSCs geneticky modifikované na uvoľňovanie liečiv, sú schopné silno inhibovať rast rakovinových buniek. Bola skúmaná aj génová terapia pomocou IFN- $\alpha$ , cytosín deaminázy, NK4 a TRAIL v rôznych modeloch nádorov (Pessina *et al.* 2015).

#### 4.1.1. MSCs ako vektor interferónov

MSCs, ktoré boli transdukované adenovirálnym vektorom, ktorý exprimoval ľudský IFN- $\beta$  (MSCs-IFN- $\beta$ -bunky), priamo inhibovali proliferáciu ľudských nádorových buniek *in vitro*. Vysoké koncentrácie samotného IFN- $\beta$  inhibujú rast malígnych buniek *in vitro*. Ak sa však IFN- $\beta$  podáva vo vysokých dávkach, tak je pre organizmus toxický. Preto ako prenášač IFN- $\beta$  do nádoru boli použité MSCs. IFN- $\beta$  ktorý produkovali MSCs-IFN- $\beta$ -bunky lokálne, v nádorovom mikroprostredí inhiboval rast malígnych buniek *in vivo*, zatiaľ čo systémovo distribuovaný IFN- $\beta$  túto schopnosť nemal. Inhibícia bola trvalá, ak sa použili MSCs, ktoré boli stabilne transdukované pomocou plazmidu, ktorý exprimuje IFN- $\beta$  pod kontrolou podmieneného promotéru. Pri zvažovaní použiť túto terapiu je nutné urobiť ešte ďalšie vyšetrenia, lebo MSCs síce migrujú selektívne len do nádorového tkaniva, ale IFN- $\beta$  môže byť uvoľnený do obehu a tým spôsobiť toxicitu iných orgánov (Studený *et al.* 2004).

#### 4.1.2. MSCs ako vektor IL-2

Potkanie MSCs boli modifikované k produkcii ľudského IL-2 (MSCs-IL-2) adenovírom. Takto modifikované MSCs predĺžili výrazne prežitie potkana s gliómom oproti kontrole bez liečby. MSCs mali tiež vynikajúcu migračnú schopnosť a inhibičné účinky na proliferáciu gliómových buniek. Takže geneticky modifikované MSCs-IL-2 jasne zvyšujú

protinádorový účinok a predlžujú život zvieracím modelom nesúcim gliómy (Hamada *et al.* 2005).

#### **4.1.3. MSCs ako vektor pre TRIAL**

MSCs izolované z menštruačnej krvi, ktoré sú modifikované adenovírusom k prenášanju TRIAL, majú pravdepodobne tiež protinádorové účinky *in vitro* aj *in vivo*. TRIAL je schopný indukovať apoptózu v nádorových bunkách. Výhodou týchto MSCs je, že vykazujú vyššiu mieru proliferácie a dajú sa získať jednoduchým, bezpečným a bezbolestným postupom, ktorý nie je eticky kontroverzný. V tejto štúdií bol použitý myšiu model, ktorému boli injektované ľudské bunky gliómu a následne MSCs modifikované k produkcii TRIAL. V tomto experimente došlo k apoptóze gliómových buniek, proliferácia týchto buniek sa tiež znížila a aj veľkosť gliómu sa znížila oproti kontrolám bez podania modifikovaných MSCs k produkcii TRIAL. Aj v *in vivo* kultivácii gliómových buniek s takto modifikovanými MSCs došlo k apoptóze gliómových buniek (Wang *et al.* 2017).

#### **4.1.4. MSCs ako vektor PEDF**

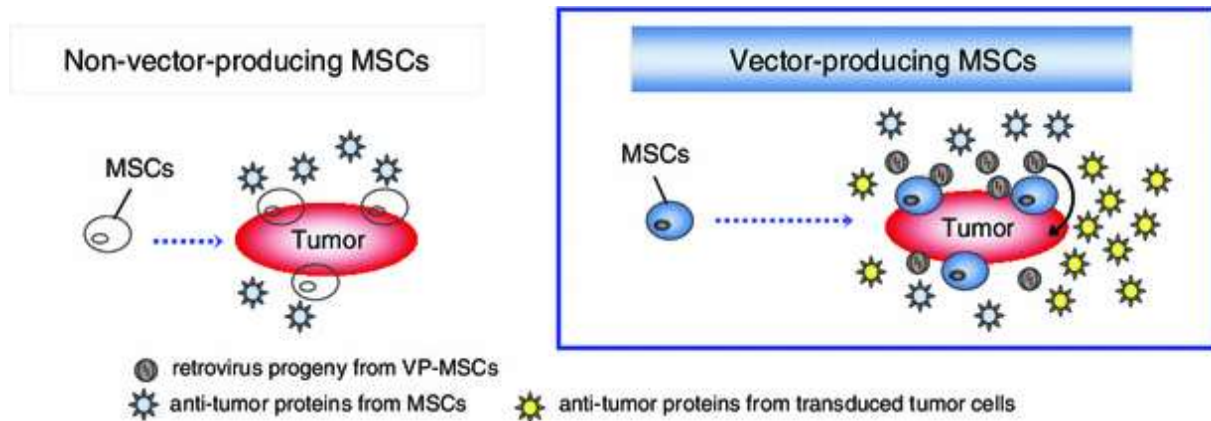
MSCs modifikované k exprimácii PEDF adenovirálnou transdukciou (MSCs-PEDF), by mohli byť v budúcnosti novou terapeutickou stratégiou pre potlačenie nádorových metastáz a inhibíciu produkcie malígneho ascitu v pokročilom kolorektálnom karcinóme s kolorektálnou peritoneálnou karcinomatózou. MSCs-PEDF inhibovali nádorovú angiogézu, vyvolávali apoptózu a obnovovali pomer vaskulárneho endotelového rastového faktoru A/rozpuštná fms-podobná tyrozín kináza-1 v ascite. Navyše MSCs-PEDF znížili produkciu adenovírus-neutralizujúcich protilátok, predĺžili expresiu PEDF a indukovali migráciu smerom k nádorovým bunkám (Yang *et al.* 2016).

#### **4.1.5. MSCs ako vektor NK4**

MSCs modifikované adenovírusovým vektorom nesúcim NK4, mali inhibičný účinok na rast a migráciu vysoko metastázujúcich buniek karcinómu pečene a na nádorovú angiogézu v zvieracom modeli. NK4 dokážu inhibovať rast, metastázu a inváziu nádorových buniek, adenovírus môže priviesť NK4 k nádoru, ale občas indukuje imunologické odmietnutie a tak pre túto štúdiu nádorov pečene boli použité modifikované MSCs transdukované adenovírusovým vektorom nesúcim NK4 na dopravenie NK4 do týchto nádorov (Cai *et al.* 2017).

## 4.2. MSCs ako nosič retrovírusových vektorov

Boli vyvinuté geneticky modifikované MSCs, ktoré sú schopné produkovať retrovírusové vektory kódujúce tymidín kinázu vírusu herpes simplex (HSV-TK), s cieľom rozšírenia účinku protinádorovej terapie (obrázok 6). Onkolytická viroterapia by mohla byť novou stratégiou liečby nádorov v budúcnosti, pri ktorej sa využijú MSCs ako nosiče onkolytických vírusov do miesta výskytu nádoru. Geneticky modifikované MSCs mali za následok inhibíciu rastu nádoru aj potlačenie metastáz a celkovo dlhšie prežitie jedinca (Uchibori *et al.* 2014). MSCs okrem toho, že môžu byť použité ako bunecné prenášače onkolytických adenovírusov k nádorom, dokážu aj zvýšiť protinádorovú odpoveď v spolupráci s účinkom onkolytických adenovírusov (Rincón *et al.* 2017).



obrázok 6

Vľavo je vidieť nemodifikované mezenchymálne kmeňové bunky (MSCs), ktoré majú schopnosť vniknúť do tumoru, a preto je lokálna expresia terapeutických molekúl závislá od prítomnosti MSCs. Vpravo sa vyskytujú geneticky modifikované vektor produkujúce MSCs, ktoré dokážu produkovať retrovírusové progény, ktoré môžu transdukovať tumorové bunky *in situ*, čím sa rozširuje expresia terapeutického činidla dokonca aj keď MSCs umreli (prevzaté z Uchibori *et al.* 2014).

## 4.3. MSCs ako vektor chaperonov onkolytických adenovírusov

Modifikované MSCs sú aj vhodným vektorom na prenos chaperonov onkolytických adenovírusov, vďaka ich preferenčnej migrácii k nádorom (Komarova *et al.* 2006). Takto liečené nádory boli osídľované makrofágmi a granulocytmi, čo môže znamenať, že vplyvom terapie došlo k zvýšeniu imunogenicity nádoru, produkcii protizápalových faktorov a iniciácii imunitnej reakcie, čomu sa nádory bránia (Xia *et al.* 2011).

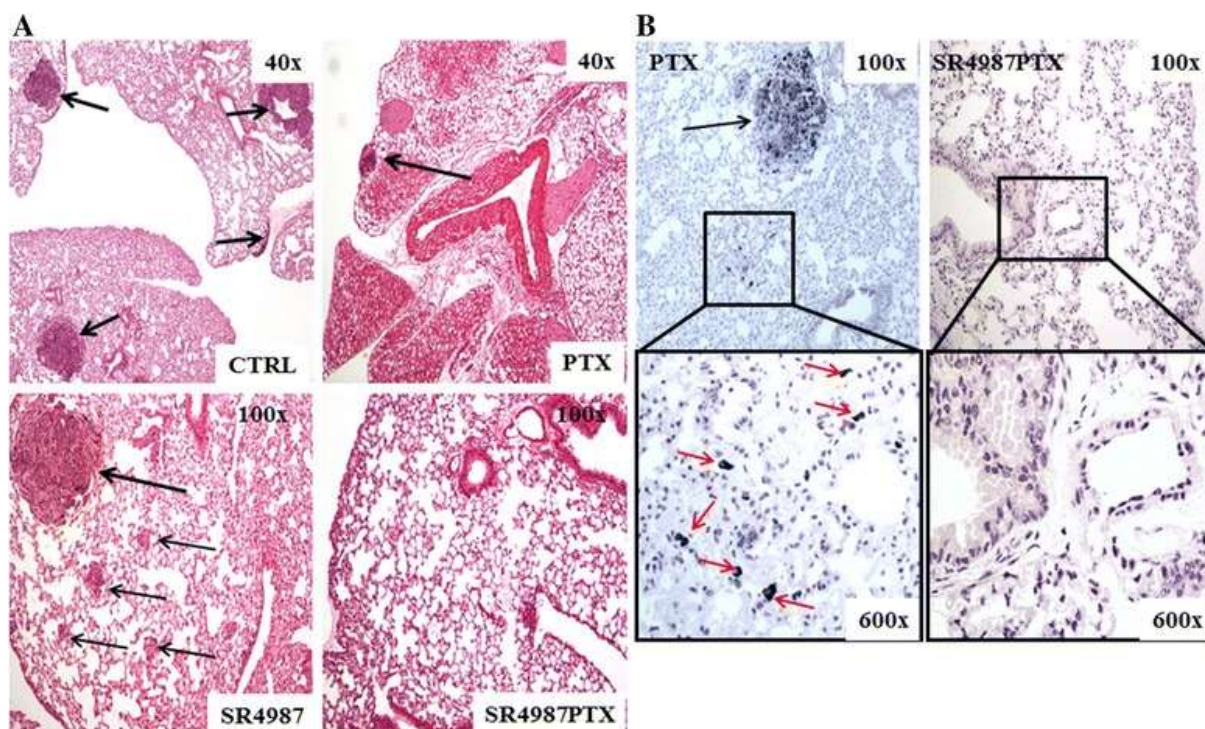
## 5. Príklady terapeutického využitia MSCs v protinádorovej terapii

V súčasnej dobe sa liečba rakoviny pomocou MSCs stále nezdá veľmi perspektívna, ale prebehlo už mnoho štúdií a aj štúdie na ľudských pacientoch, ktoré ukázali, že MSCs

v organizme nepôsobili toxicky, a preto by mohli byť v budúcnosti použité v protinádorovej terapii. MSCs by bolo možné využiť aj ako zdroj buniek v bunečnej terapii, ktorá by mohla byť po bližšom preskúmaní jednou zo stratégií v liečbe nádorov (Studený *et al.* 2002).

### **5.1. Pôsobenie hMSCs obsahujúcich paklitaxel na pľúcne metastázy**

hMSCs pri expozícii veľmi vysokými dávkami chemoterapeutických látok ako je paklitaxel (PTX) (hMSCs-PTX) *in vitro*, môžu získať silnú protinádorovú aktivitu. Pri podaní hMSCs-PTX injekčne *in vivo*, ale aj do tumoru, bola evidovaná silná inhibícia rastu nádorových buniek (Pessina *et al.* 2011). Z hMSCs sa stanú hMSCs uvoľňujúce liek, pretože sú schopné prijímať a uvoľňovať liek a tým zabíjať nádorové bunky, ktoré sa nachádzajú v ich blízkosti (Pessina *et al.* 2015). Túto vlastnosť majú hMSCs derivované z kostnej drene, ale aj z tukového tkaniva (Bonomi *et al.* 2013). hMSCs-PTX, sa ukazujú ako veľmi účinné pri inhibícii tvorby pľúcnych metastáz v modele imunodeficientných a syngénnych myší, ktorým boli injekčne podané ľudské rakovinové bunky. V skutočnosti je liečba pľúcnych metastáz dosť nepravdepodobná, a tak by hMSCs-PTX mohli predstavovať nový spôsob terapie v boji proti pľúcny metastázam a primárnemu karcinómu pľúc človeka, čo si vyžaduje ďalšie klinické štúdium (Pessina *et al.* 2015). Výsledky ukázali, že po intravenóznom podaní hMSCs-PTX, boli zrušené takmer všetky pľúcne metastázy v myšom modeli (obrázok 7). Protinádorové účinky hMSCs-PTX boli skúšané aj s inými liečivami ako je vinkristín, ale aj liekmi s iným mechanizmom účinku, napríklad gemcitabín a doxorubicín. Zatiaľ sa nevie, či by táto liečba mohla fungovať synergicky u človeka, ale určite je toto zistenie pozoruhodné (Pessina *et al.* 2015).



**obrázok 7**

Histologické vyšetrenie pľúc ukazuje potencióálnu protimetastickú aktivitu SR4987PTX (myši liečené pomocou ľudských mezenchymálnych kmeňových buniek po expozícii paklitaxelom) terapie. Vľavo na obrázku A môžeme vidieť histologické rezy prezentujúce niekoľko pľúcnych zhlukov (čierne šípky) v kontrolnej myši (CTRL) a v SR4987PTX liečenej myši. Niektoré metastázy sú prítomné u myši liečených veľmi vysokou dávkou paklitaxelu (PTX) (10 mg/kg), zatiaľ čo myši ošetrené prípravkom SR4987PTX sú bez metastatických zhlukov. Vpravo na obrázku B je ukázaná prítomnosť mikrometastáz pľúc (červené šípky) v PTX a ich neprítomnosť u myši ošetrených SR4987PTX (zväčšenie 600x) (prevzaté z Pessina *et al.* 2015).

## 5.2. Tepelne ošetrené hMSCs v modele ľudského ovariálneho adenokarcinómu

Tepelne ošetrené hMSCs tiež dokážu znižovať počet a životaschopnosť rakovinových buniek. hMSCs derivované z tukového tkaniva a z plodovej vody boli vystavené tepelnému šoku 43°C po dobu 45 minút, potom boli inkubované 24 hodín pri 37°C, a tak boli transferované do buniek ľudského ovariálneho adenokarcinómu *in vivo*. Prietoková cytometria ukázala, že tepelne spracovanie hMSCs nevedlo k žiadnej identifikovateľnej zmene molekúl, či štruktúrnemu poškodeniu hMSCs. Tieto výsledky naznačujú, že rozpustné faktory sekretované z MSCs majú silné inhibičné účinky na rast nádorových buniek a že hypertermia môže uľahčiť produkciu a sekréciu týchto faktorov z MSCs. Rozpustné faktory produkované MSCs vytvorili antitumorogénne mikroprostredie, ktoré robí nádorové bunky náchylnejšie k bunečnej smrti. (Cho *et al.* 2009).

### **5.3. Koncentrát ľudských kmeňových buniek Whartonovho rôsolu**

Stimulácia imunitnej odpovedi pomocou koncentráту ľudských kmeňových buniek Whartonovho rôsolu (human Wharton's jelly stem cells conditioned medium, hWJSC-CM) môže poskytnúť trvalú protinádorovú odpoveď, ktorá by mohla spôsobiť útlm alebo úplne odstránenie rakoviny. Expozícia buniek lymfómu pomocou hWJSC-CM umožňuje nielen prezentáciu s nebezpečím asociovaných molekulárnych vzorov (danger associated molecular patterns, DAMP) k vyvolaniu imunitnej odpovedi, ale aj súbežnú downreguláciu expresie CD274 a CD47 na bunkách lymfómu, čo ich robí náchylnejšími k antitumorovej imunite. Bunky Burkittovho lymfómu boli významne inhibované v prítomnosti hWJSC-CM. Smrť lymfomatičských buniek bola navodená prevažne apoptózou a nekrozou (Lin *et al.* 2017).

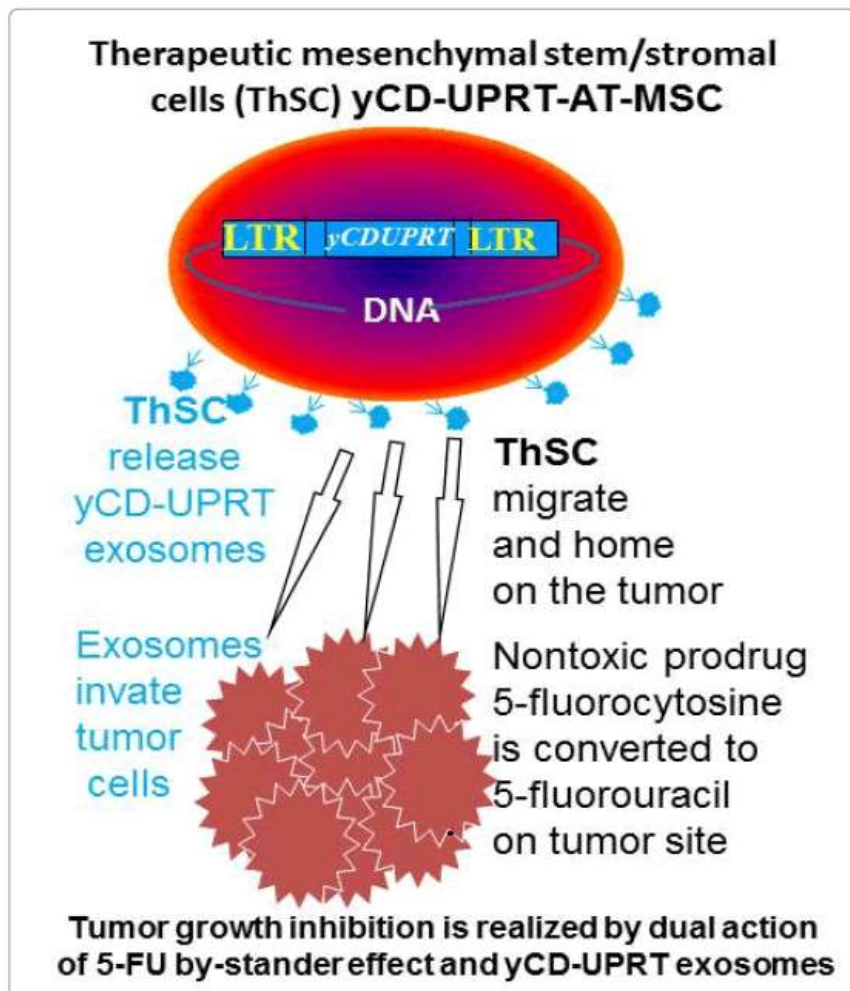
### **5.4. hMSCs ako nosič LIGHT v protinádorovej terapii rakoviny žalúdka**

V štúdiu terapie rakoviny žalúdka sa hMSCs získané z pupočníkovej krvi skúmali ako nosič pre konštantný zdroj transgenného tumor nekrotizujúceho faktoru z nadrodiny 14 (tumor necrosis factor superfamily member 14, TNFSF14 (LIGHT)) (hMSCs-LIGHT) k nádorovým bunkám *in vivo*. Liečba pomocou hMSCs transfekovaných LIGHT dokázala silný potlačujúci účinok na rast nádorov. Vyšetrenie patologickej časti nádorového tkaniva ukázalo, že oblasti nádorovej nekrózy boli väčšie. hMSCs-LIGHT sú tiež schopné významne indukovať apoptózu nádorových buniek. To znamená, že hMSCs z pupočníkovej krvi majú veľký potenciál byť použité ako účinný nosič pri liečbe žalúdočnej rakoviny. hMSCs sa síce získavajú z pupočníkovej krvi horšie ako z kostnej drene, ale majú dlhšiu životnosť a vyššiu reprodukčnú aktivitu, čo ich robí pre liečbu atraktívnejšie. Pomocou lentivírovej transfekcie sa podarilo hMSCs modifikovať tak, že dokážu vylučovať LIGHT v miestach nádorov. V štúdiu sa používa myšší model rakoviny žalúdka, do ktorého boli hMSCs-LIGHT injektované. LIGHT má potencionalný protinádorový účinok, ale aby sa zabránilo systémovej toxicite, využívajú sa hMSCs na jeho priamy prenos do nádorového tkaniva. hMSCs získané z pupočníkovej krvi transfekované LIGHT, špecificky indukovali apoptózu cez aktiváciu kaspázy 3 (Zhu *et al.* 2013).

### **5.5. hMSCs transdukované k vylučovaniu yCD-UPRT**

hMSCs derivované z tukového tkaniva a kostnej drene boli geneticky upravené exprimovať cytozín deamináza::uracil fosforibozyltransferáza (yCD-UPRT), a potom boli vpichneté spolu s 5-fluorouracilom do mozgu potkana s glioblastómom (obrázok 8). Táto terapia pomocou hMSCs v kombinácii s liečivom spôsobila deštrukciu ako nádorových buniek,

tak aj miesta, kde sa nachádzajú bunky iniciujúce glioblastóm. To viedlo k silnej inhibícii rastu nádoru a objavili sa aj zvieracie modely s úplným vyliečením (Altaner *et al.* 2014). Terapeutický potenciál takto upravených MSCs je univerzálny a celkom efektívny. Vektorové zloženie a jedinečné vlastnosti MSCs prispievajú k vysokej terapeutickému účinnosti, avšak táto štúdia potrebuje ešte hlbšie preskúmanie (Altaner 2015).



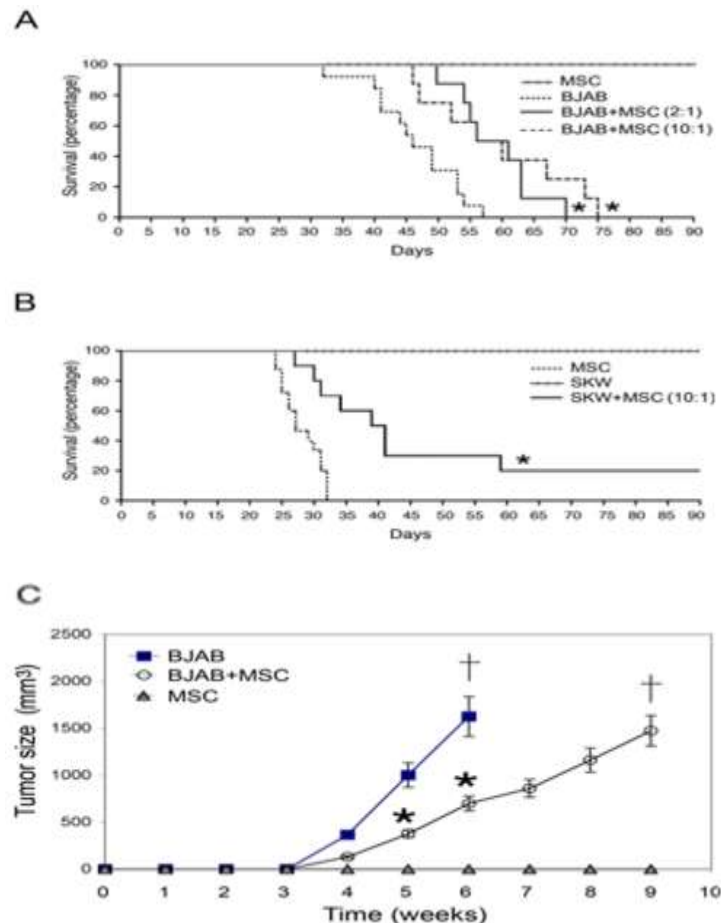
**obrázok 8**

Schematické znázornenie ľudských mezenchymálnych kmeňových buniek (hMSCs), ktoré sprostredkovávajú liečivú génovú terapiu rakoviny. hMSCs transdukované k expresii cytozín deamináza:uracil fosforibozyltransferázy (yCD-UPRT) (yCD-UPRT-AT-MSC), ktorá uvoľňuje exozómy smerom k nádoru, ktoré v kombinácii s 5-fluorouracilom (5-FU) zodpovedajú za vysokú terapeutickú účinnosť yCD-UPRT-AT-MSC/5-FU systému (prevzaté a upravené podľa Altaner 2015).

### **5.6. Protinádorový vplyv hMSCs na Non-Hodgkinov lymfóm**

hMSCs derivované z kostnej drene môžu mať tiež protinádorový vplyv na Non-Hodgkinov lymfóm (NHL). Štúdia bola vykonaná na myšom modeli s NHL, ktorému boli hMSCs injektované intraperitoneálne. Výrazne dlhšie preživali zvieracie modely s NHL po injekčnom podaní hMSCs (obrázok 9). Okrem toho boli pozorované masívne oblasti

vnútrobunkových nekroz u zvieracích modelov, ktorým boli spolu s lymfomatičnými bunkami injektované aj hMSCs a to predstavovalo zníženie nádorovej hmoty, vzhľadom ku kontrolám, ktorým boli injektované len bunky lymfómu, u ktorých ku žiadnej nekroze nedošlo (Secchiero *et al.* 2010).



**obrázok 9**

Injekcia ľudských mezenchýmových kmeňových buniek (hMSCs) derivovaných z kostnej drene predĺžila prežitie xenoimplantátov Non-Hodgkinovho lymfómu (NHL) s indolentným lymfoblastoidom (BJAB) a s agresívnym lymfoblastoidom (SKW6.4.). V časti A môžeme vidieť, že modely injektované BJAB v kombinácii s hMSCs prežili dlhšie ako kontroly, ktoré boli injektované len BJAB. Taktiež pri zvýšení dávky hMSCs nedošlo k výrazným zmenám. V časti B môžeme vidieť, že zvieracie modely injektované SKW6.4. v kombinácii s hMSCs prežili dlhšie, ako zvieracie kontroly injektované len SKW6.4. V časti C môžeme vidieť, že nádory v modeli BJAB+hMSCs mali spomalený rast oproti modelu injektovanému len samotnými BJAB. Tieto výsledky dokazujú, že hMSCs sú schopné predlžovať život v modeloch s NHL (prevzaté z Secchiero *et al.* 2010).

## 5.7. hMSCs ako vektor HSV-TK v kombinácii s ganciklovírom

Geneticky modifikované hMSCs k exprimovaniu HSV-TK v kombinácii s ganciklovírom (GCV) boli preukázané ako prijateľná bezpečná a znášateľná liečba u pacientov s pokročilým gastrointestinálnym adenokarcinómom. Táto klinická štúdia bola prvá, v ktorej sa študovali účinky geneticky upravených hMSCs na ľuďoch. V tejto štúdii boli pacientom najskôr podané geneticky modifikované hMSCs a potom infúzia s GCV. HSV-TK katalyzuje fosforyláciu prekurzoru GCV na toxickú zlúčeninu GCV trifosfát a používa sa ako sebevražebný gén. Fosforylovaný GCV inhibuje DNA polymerázu, a tým indukuje apoptózu. Tento metabolit difunduje do okolia a stáva sa vražebným nielen pre seba, ale aj pre okolné nádorové bunky (Von Einem *et al.* 2017).

## 5.8. Podporná liečba pomocou hMSCs

hMSCs derivované z kostnej drene boli transplantované 15 ženám s lymfedémom po operácii rakoviny prsníka. Kontrolu tvorilo 35 pacientiek liečených komplexnou dekongestačnou fyzioterapiou. Výsledky ukázali, že autológna transplantácia hMSCs derivovaných z kostnej drene výrazne znížila objem lymfedému a pacientky nemali bolesti spôsobené opuchom. Táto terapia dávala lepší dlhodobý výsledok oproti kontrolám. Lenže táto štúdia trvala len rok a po roku sa v nej už nepokračovalo. Z uvedeného vyplýva, že je potrebné urobiť ďalšie štúdie k určeniu presnejšieho výsledku a k vylúčeniu nežiadúcich účinkov (Hou *et al.* 2008).

## 6. Záver

Táto práca zhrňuje súčasné znalosti o úlohách MSCs v protinádorových terapiách a o mechanizmoch účinku na inhibíciu rakovinových buniek.

Vďaka protinádorovým účinkom majú MSCs veľký potenciál na široké terapeutické využitie pri liečení rôznych druhov nádorov. Je možné, že MSCs majú aj schopnosť rast nádorov podporovať, a preto sa na to musí brať ohľad pri výbere terapie. Práve kvôli tomuto efektu sú objektom štúdie hlavne ťažko liečiteľné nádory. Pokus, v ktorom MSCs inhibovali rast gliómových buniek dokonca ukázal aj to, že ani po mesiaci skúmania sa MSCs nestali v myšom modeli tumorogénne a nenašiel sa ani žiadny nádorový zhuk (Ho *et al.* 2013). MSCs pôsobili v organizme netoxicky, a ich ďalšie štúdium by mohlo v budúcnosti prispieť k vývinu terapie, ktorá by mohla nahradiť liečbu rakoviny pomocou chemoterapie.

V súčasnosti nie je úplne jasné, za akých presných podmienok MSCs dokážu inhibovať nádorové bunky, a preto je potrebné tieto faktory viac preštudovať. Predpokladá sa, že na mechanizme inhibície rakovinových buniek pomocou MSCs sa podieľa niekoľko faktorov, ako je napríklad produkcia protinádorových látok MSCs, ich migrácia do miesta nádoru, regenerácia poranených tkanív, schopnosť prenášania terapeutických liečiv do týchto miesta aj iné vyššie spomínané faktory. Genetická modifikácia MSCs môže tiež zosilniť ich protinádorový účinok. MSCs sú preto jednou z najzaujímavejších oblastí výskumu kmeňových buniek, ktoré vyžadujú ďalšie vyšetrenie ich klinického použitia. Na základe toho by sa mohol z MSCs stať sľubný prostriedok novej terapie v regeneratívnej a protinádorovej medicíne.

### **Zoznam použitej literatúry:**

**Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., Lotz, M., 2004.** Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50, 1522-1532.

**Altaner, C., 2015.** Prodrug gene therapy for cancer mediated by mesenchymal stem/stromal cells engineered to express yeast cytosinedeaminase::uracilphosphoribosyltransferase. *J Stem Cell Res Ther* 5, 264.

**Altaner, C., Altanerova, V., Cihova, M., Ondicova, K., Rychly, B., Baciak, L., Mravec, B., 2014.** Complete regression of glioblastoma by mesenchymal stem cells mediated prodrug gene therapy simulating clinical therapeutic scenario. *Int J Cancer* 134, 1458-1465.

**Anthony, D., Shiels, P., 2013.** Exploiting paracrine mechanisms of tissue regeneration to repair damaged organs. *Transplant Res* 2, 10.

**Barry, F.P., Murphy, J.M., 2004.** Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 568-584.

**Bongso, A., Fong, C.Y., 2013.** The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 9, 226-240.

**Bonomi, A., Coccè, V., Cavicchini, L., Sisto, F., Dossena, M., Balzarini, N., Portolani, N., Ciusani, E., Parati, E., Alessandri, G., Pessina, A., 2013.** Adipose tissue-derived stromal cells primed in vitro with paclitaxel acquire anti-tumor activity. *Int J Immunopathol Pharmacol* 26, 33-41.

**Cai, C., Hou, L., Zhang, J., Zhao, D., Wan, Z., Hu, H., He, J., Guan, W., Ma, Y., 2017.** The inhibitory effect of mesenchymal stem cells with rAd-NK4 on liver cancer. *Appl Biochem Biotechnol* 183, 444-459.

**Caplan, A.I., Dennis, J.E., 2006.** Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98, 1076-1084.

**Chen, X., Armstrong, M.A., Li, G., 2006.** Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol* 84, 413-421.

**Chen, X., Lin, X., Zhao, J., Shi, W., Zhang, H., Wang, Y., Kan, B., Du, L., Wang, B., Wei, Y., Lui, Y., Zhao, X., 2008.** A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs. *Mol Ther* 16, 749-756.

**Cho, J.A., Park, H., Kim, H.K., Lim, E.H., Seo, S.W., Choi, J.S., Lee, K.W., 2009.** Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line. *Cancer* 115, 311-323.

**Clarke, M.R., Imhoff, F.M., Baird, S.K., 2015.** Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2. *Mol Carcinog* 54, 1214-1219.

**Cousin, B., Ravet, E., Poglio, S., De Toni, F., Bertuzzi, M., Lulka, H., Touil, I., André, M., Grolleau, J.L., Péron, J.M., Chavoïn, J.P., Bourin, P., Pénicaud, L., Buscail, L., Cordelier, P., 2009.** Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *Plos One* 4.

**Dasari, V.R., Kaur, K., Velpula, K.K. Gujrati, M., Fassett, D., Klopfenstein, J.D., Dinh, D.H., Rao, J.S., 2010.** Upregulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/AKT pathway. *PLoS One* 5.

**De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., Luyten, F.P., 2001.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44, 1928-1942.

**Djouad, F., Ponce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D., Jorgensen, C., 2003.** Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844.

**Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E., 2006.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

**Erices, A., Conget, P., Minguell, J.J., 2000.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242.

**Hamada, H., Kobune, M., Nakamura, K., Kawano, Y., Kato, K., Honmou, O., Houkin, K., et al., 2005.** Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci* 96, 149-156.

- Ho, I.A., Chan, K.Y., Ng, W.H., Guo, C.M., Hui, K.M., Cheang, P., Lam, P.Y., 2009.** Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma. *Stem Cells* 27, 1366-1375.
- Ho, I.A., Toh, H.C., Ng, W.H., Teo, Y.L., Guo, C.M., Hui, K.M., Lam, P.Y., 2013.** Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis. *Stem Cells* 31, 146-155.
- Hou, C., Wu, X., Jin, X., 2008.** Autologous bone marrow stromal cells transplantation for the treatment of secondary arm lymphedema: A prospective controlled study in patients with breast cancer related lymphedema. *Jpn J Clin Oncol* 38, 670-674.
- Jones, B.J., McTaggart, S.J., 2008.** Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol* 36, 733-741.
- Khakoo, A.Y., Pati, S., Anderson, S.A., Reid, W., Elshal, M.F., Rovira, I.I., Nguyen, A.T., et al., 2006.** Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 203, 1235-1247.
- Komarova, S., Kawakami, Y., Stoff-Khalili, M.A., Curiel, D.T., Pereboeva, L., 2006.** Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Molecular Cancer Therapeutics* 5, 755-766.
- Lee, H.Y., Hong, I.S., 2017.** Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Sci* 108, 1939-1946.
- Lin, D.H., Biswas, A., Choolani, M., Fong, C.Y., Bongso, A., 2017.** Induction of immunogenic cell death in lymphoma cells by Wharton's jelly mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Rev*.
- Markow, V., Kusumi, K., Tadesse, M.G., Wiliam, D.A., Hall, D.M., Lounev, V., Carlton, A., et al., 2007.** Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem cells Dev* 16, 53-73.
- Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., et al. 2007.** Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* 5, 57.

- Molloy, A.P., Martin, F.T., Dwyer, R.M., Griffin, T.P., Murphy, M., Barry, F.P., O'Brien, T., et al., 2009.** Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *Int J Cancer* 124, 326-332.
- Nauta, A., Fibbe, W., 2007.** Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.
- Niess, H., Thomas, M.N., Schiergens, T.S., Kleespies, A., Jauch, K.W., Bruns, C., Werner, J., et al., 2016.** Genetic engineering of mesenchymal stromal cells for cancer therapy: turning partners in crime into Trojan horses. *Innov Surg Sci* 1, 19-32.
- Otsu, K., Das, S., Houser, S.D., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J., 2009.** Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 113, 4197-4205.
- Pessina, A., Bonomi, A., Coccè, V., Invernici, G., Navone, S., Cavicchini, L., Sisto, F., et al., 2011.** Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy. *PLoS One* 6.
- Pessina, A., Leonetti, C., Artuso, S., Benetti, A., Dessy, E., Pascucci, L., Passeri, D., Orlandi, A., et al., 2015.** Drug-releasing mesenchymal cells strongly suppress B16 lung metastasis in a syngeneic murine model. *J Exp Clin Cancer Res* 34, 82.
- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonné, A., Delorme, B., Hérault, O., Charbord, P., Domenech, J., 2007.** The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737-1745.
- Prockop, D.J., 2009.** Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 17, 939-946.
- Qiao, L., Xu, Z., Zhao, T., Shi, M., Zhao, R.C., Ye, L., Zhang, X., 2008a.** Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 4, 500-507.
- Qiao, L., Xu, Z.L., Zhao, T.J., Ye, L.H., Zhang, X.D., 2008b.** Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signaling. *Cancer Lett* 269, 67-77.

- Ramasamy, R., Lam, E.W., Soeiro, I., Tisato, V., Bonnet, D., Dazzi, F., 2007.** Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: Impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 21, 304-310.
- Rhee, K.J., Lee, J.I., Eom, Y.W., 2015.** Mesenchymal stem cell-mediated effects of tumor support or suppression. *Int J Mol Sci* 16, 30015-30033.
- Rincón, E., Cejalvo, T., Kanojia, D., Alfranca, A., Rodríguez-Milla, M.A., Gil Hoyos, R.A., Han, Y., et al., 2017.** Mesenchymal stem cell carriers enhance antitumor efficacy of oncolytic adenoviruses in an immunocompetent mouse model. *Oncotarget* 8, 45415-45431.
- Secchio, P., Zorzet, S., Tripodo, C., Corallini, F., Melloni, E., Caruso, L., Bosco, R., et al., 2010.** Human bone marrow mesenchymal stem cells display anti-cancer activity in SCID mice bearing disseminated non-Hodgkin's lymphoma xenografts. *PLoS One* 5.
- Seo, K.W., Lee, H.W., Oh, Y.I., Ahn, J.O., Koh, Y.R., Oh, S.H., Kang, S.K., Youn, H.Y., 2011.** Anti-tumor effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell-based interferon- $\beta$  gene therapy and cisplatin in a mouse melanoma model. *Cytotherapy* 13, 944-955.
- Si, Y.L., Zhao, Y.L., Hao, H.J., Fu, X.B., Han, W.D., 2011.** MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev* 10, 93-103.
- Spaeth, E., Marini, F., 2011.** Dissecting mesenchymal stem cell movement: migration assays for tracing and deducing cell migration. *Methods Mol Biol* 750, 241-259.
- Studený, M., Marini, F.C., Dembinski, J.L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B.N., Champlin, R.E., Andreeff, M., 2004.** Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 96, 1593-1603.
- Studený, M., Marini, F.C., Champlin, R., Zompetta, C., Fidler, I., Andreeff, M., 2002.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 62, 3603-3608.
- Tille, J.C., Pepper, M.S., 2002.** Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 280, 179-191.
- Troyer, D.L., Weiss, M.L., 2008.** Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells* 26, 591-599.

**Tsai, M.S., Lee, J.L., Chang, Y.J., Hwang, S.M., 2004.** Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 19, 1450-1456.

**Uchibori, R., Tsukahara, T., Ohmine, K., Ozawa, K., 2014.** Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells. *Int J Hematol* 99, 377-382.

**Von Einem, J.C., Peter, S., Günther, C., Volk, H.D., Grütz, G., Salat, C., Stoetzer, O., et al., 2017.** Treatment of advanced gastrointestinal cancer with genetically modified autologous mesenchymal stem cells – TREAT-ME-1 – a phase I, first in human, first in class trial. *Oncotarget* 8, 80156-80166.

**Wang, J.C., Doedens, M., Dick, J.E., 1997.** Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 89, 3919-3924.

**Wang, X.J., Xiang, B.Y., Ding, Y.H., Chen, L., Zou, H., Mou, X.Z., Xiang, C., 2017.** Human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells as a cellular vehicle for malignant glioma gene therapy. *Oncotarget* 8, 58309-58321.

**Xia, X., Ji, T., Chen, P.B., Li, X., Fang, Y., Gao, Q.L., Liao, S.J., You, L.Y., Xu, H.B., Ma, Q.F., et al., 2011.** Mesenchymal stem cells as carriers and amplifiers in CRAd delivery to tumors. *Molecular Cancer* 10, 12.

**Xie, W., Schultz, M.D., Lister, R., Hou, Z., Rajagopal, N., Ray, P., Whitaker, J.W., Tian, S., Hawkins, R.D., Leung, D., et al, 2013.** Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell* 153, 1134-1148.

**Yang, H.U., Chao, K.C., 2013.** Foetal defense against cancer: a hypothesis. *J Cell Med* 17, 1096-1098.

**Yang, L., Zhang, Y., Cheng, L., Yue, D., Ma, J., Zhao, D., Xiaoming, H., et al., 2016.** Mesenchymal stem cells engineered to secrete pigment epithelium-derived factor inhibit tumor metastasis and the formation of malignant ascites in a murine colorectal peritoneal carcinomatosis model. *Hum Gene Ther* 27, 267-277.

**Zhu, Y., Su, D., Xuan, S., Ma, G., Dai, Z., Liu, T., Tang, D., et al., 2013.** Gene therapy of gastric cancer using LIGHT-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Gastric Cancer* 16, 155-166.

**Zhu, Y., Sun, Z., Han, Q., Liao, L., Wang, J., Bian, C., Yan, X., et al., 2009.** Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 23, 925-933.

**Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., Maini, R.N., 2000.** Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2, 477-488.

**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 Eng* 7, 211-228.