

MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY V TEORII A PRAXI

Habilitační práce

RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

2017

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala Dr. Marii Lipoldové, pod jejímž vedením jsem vstoupila do světa imunologie. Prošly jsme spolu začátky projektu analýzy genů kontrolujících imunitní odpověď u myši pomocí modelu rekombinantních kongenních kmenů. Nezapomenu na celonoční pokusy a nadšení z prvních výsledků.

Dále děkuji Prof. Vladimíru Holáňovi, který mě zasvětil do transplantační imunologie a se kterým jsem začala objevovat poezii mezenchymálních kmenových buněk. Vladimírovi děkuji nejen za formování kritických postojů a přístupů k vědecké práci.

Děkuji také všem svým studentům, především Elišce Javorkové a Michaele Hájkové, které mi vždy byly inspirací a motivací pro další práci. Poděkování za příjemné a motivující laboratorní prostředí také spolupracovníkům z Katedry buněčné biologie a Katedry fyziologie, Velkou pomocí při práci na mých projektech mi byli také spolupracovníci z Ústavu molekulární genetiky a poté z Ústavu experimentální medicíny.

Velké díky patří mé rodině, rodičům a především Filipovi, bez jejichž podpory a lásky by svět byl mnohem šedivější.

Obsah

Úvod	1
Historie MSC.....	2
Definice MSC	3
Migrace MSC	4
Faktory ovlivňující migraci a kultivaci MSC	5
Přežívání aplikovaných MSC.....	5
Působení MSC na imunitní systém.....	8
MSC a buněčná terapie	11
Terapie GVHD.....	11
Terapie kardiovaskulárních onemocnění.....	12
Terapie kloubních onemocnění.....	13
Terapie dalších onemocnění	14
MSC a transplantace	14
Transplantace kůže	15
Poškození oka.....	16
Shrnutí.....	18
Shrnutí vybraných publikací	19
Prevention of corneal allograft rejection in a mouse model of high risk recipients (Vitova et al., 2004).....	19
A rapid separation of two distinct populations of mouse corneal epithelial cells with limbal stem cell characteristics by centrifugation on Percoll gradient (Krulova et al., 2008)	20
Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds (Zajicova et al., 2010)	21
Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression (Holan et al., 2011)	22
Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon-gamma-treated mesenchymal stromal cells (Javorkova et al., 2014)	23
The supportive role of insulin-like growth factor-I in the differentiation of murine mesenchymal stem cells into corneal-like cells (Trosan et al., 2012).....	24
A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype (Hajkova et al. 2015)	25
The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population (Svobodova et al., 2012).....	27

Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN-gamma-treated mesenchymal stem cells (Hermankova et al., 2016).....	28
Mesenchymal stem cells attenuate the adverse effects of immunosuppressive drugs on distinct T cell subpopulations (Hajkova et al. 2016)	28
Seznam literatury	30
Přílohy	41

Úvod

Kmenové buňky představují naději i výzvu pro medicínu 21. století. Část lékařské obce ji považuje za součást budoucnosti medicíny, část je zdrženlivá.

V první řadě je důležité uvést, že pojem kmenová buňka neznamena jedinečný buněčný typ. Jedná se o celou řadu buněk, které se liší svým původem, morfologií i vlastnostmi. Kmenové buňky jsou definovány splněním dvou základních podmínek: schopností sebeobnovy a možností diferenciaci na různé buněčné typy. Podle původu můžeme kmenové buňky rozdělit na embryonální, indukované pluripotentní a kmenové buňky izolované z dospělého organismu.

Značnou výhodou embryonálních kmenových buněk je jejich pluripotence, zásadní nevýhodou jsou etické problémy při jejich získávání. Indukované pluripotentní kmenové buňky se připravují reprogramováním somatických buněk, vnesením genů spojených s pluripotencí. Hlavní uvažovanou výhodou je možnost přípravy syngenních kmenových buněk u kterých nedochází k aktivaci buněk imunitního systému. Nicméně tyto předpoklady se prozatím nenaplnily a navíc je značným problémem nízká účinnost reprogramování a onkogenní potenciál takto připravených buněk.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem jsou současnosti kmenové buňky získané z dospělého organismu, a zejména mezenchymální kmenové buňky, nejvíce studovaným typem. Probíhá řada studií, včetně I a II fáze klinických studií, využívajících především jejich imunomodulační a diferenciacní schopnosti.

V současnosti je léčba pomocí kmenových buněk ve stádiu výzkumu. I když bezpečnost a léčebné vlastnosti kmenových buněk nejsou potvrzeny v klinických studiích, vzbuzují značnou naději u pacientů, zejména se závažnými typy degenerativních onemocnění. K experimentální léčbě se čeští pacienti dostávají jen velmi obtížně, kmenové buňky se tak stávají předmětem obchodu, což vzbuzuje pochybnosti o etice jejich používání a názory na léčbu pomocí kmenových buněk jsou v naší společnosti velmi kontroverzní.

Proto je cílem této práce shrnout současné znalosti o mezenchymálních kmenových buňkách, včetně uvažovaných možnostech léčby a případných komplikacích jejich použití.

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) tvoří skupinu fenotypově heterogenních buněk, která se nachází ve většině tkání těla, tvoří rezervoár pro jejich obnovu a v případě zánětu interaguje s buňkami imunitního systému. MSC disponují multipotentní diferenciací kapacitou, takže jsou schopny diferencovat v mezodermální a transdiferencovat v endodermální i ektodermální buněčné linie. Původní představy proto předpokládaly, že MSC budou využívány pro nahrazení nefunkčních buněk, případně tkání. V současnosti se předpokládá, že MSC především podporují rezidentní progenitorové buňky a podílejí se na modulaci imunitních reakcí a jejich případné využití je cíleno především tímto směrem.

MSC mohou být relativně snadno izolovány a expandovány in vitro a spolu s významnými imunomodulačními vlastnostmi a nízkou imunogenicitou tak představují nadějný nástroj pro buněčnou terapii. Jejich potenciál je studován v řadě oblastí klinické praxe, do roku 2015 bylo registrováno více než 560 klinických studií (<http://clinicaltrials.gov/>), zahrnujících sledování širokého spektra využití imunomodulačních, regenerativních, případně anti-mikrobiálních vlastností exogeně aplikovaných MSC. Nicméně přesné mechanismy jejich působení nejsou známy, rozporuplné jsou také studie o délce přežití MSC v organismu po transplantaci i jejich migračních schopnostech. Proto studium těchto buněk stále nabízí podnětné možnosti.

Historie MSC

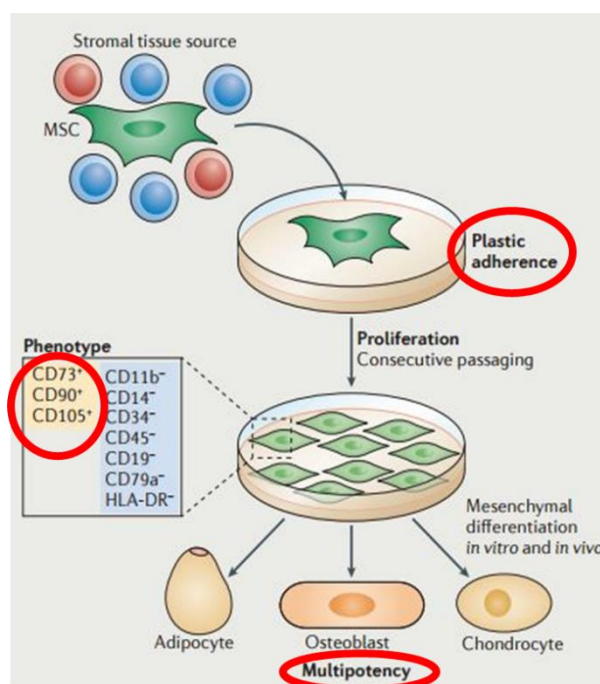
První předpoklad o přítomnosti nehematopoietických buněk v kostní dřeni vznikl v roce 1867 pozorováním německého patologa Julia Friedricha Cohnheima (rew. (Prockop, 1997). Cohnheim inspirován svými zkušenostmi z války, se zabýval procesem hojení ran. V rámci svých výzkumů injikoval nerozpustnou anilinovou barvu do žíly pokusným zvířatům a sledoval vzhled buněk obsahujících barvu v ráně vzdálené od místa aplikace barvy. Svá pozorování uzavřel tvrzením, že většina buněk lokalizovaných v místě kožního poranění přichází z krevního oběhu a tedy z kostní dřene. Některé z buněk v ráně vykazovaly specifickou morfologii podobnou fibroblastům. Předpoklad vycházející z Cohnheimova práce, tedy že kostní dřeň je zdrojem fibroblastů připravených pro hojení ran, nebyl nikdy potvrzen. Přítomnost nehematopoietických buněk v kostní dřeni vyřešila až práce Alexandra Friedensteina o řadu let později. Ten v řadě experimentů prokázal v kostní dřeni existenci prekursorů osteoblastů. Když kultivoval adherentní buňky získané

z kostní dřeně *in vitro*, pozoroval kolonie nefagocytujících buněk tvarem podobným fibroblastům. Pokud byly tyto kolonie transplantovány syngenním příjemcům, došlo k jejich diferenciaci na kostní tkáň.

V 80-tých a 90-tých letech byly tyto výsledky potvrzeny a dále bylo zjištěno, že buňky, které Friedenstein nazval osteogenní kmenové buňky mohou diferencovat také v chondrocyty a adipocyty (review Prockop, 1997), proto je Arnold Caplan později označil dnes používaným termínem MSC (Caplan, 1991).

Definice MSC

Komplikací pro práci s MSC je neexistence specifického znaku, který by umožnil jejich identifikaci a izolaci. Jako minimální kritéria pro MSC byla určena schopnost adherence k plastu, schopnost diferenciaci a přítomnost některých povrchových znaků (CD105, CD90 a CD73) a naopak nepřítomnost hematopietických znaků (CD34, CD45a CD14) (Dominici et al., 2006). Nicméně *in vivo* charakterizace je ještě složitější a proto chování kmenových buněk v dospělém organismu zůstává stále nejasné.



Obr. 1 Kritéria definující MSC (Le Blanc and Mougiakakos, 2012)

Lidské tělo si v průběhu evoluce vyvinulo řadu obranných a opravných mechanismů. Často však imunitní systém a mechanismy regenerace působí protichůdně a zdravotní stav organismu je výsledkem boje mezi těmito dvěma systémy. MSC mají regenerativní vlastnosti a podílejí se také na kontrole imunitního systému. Proto pochopení jejich působení v organismu a následné využití v klinické praxi může přinést značné výhody. V současnosti je prokázáno, že MSC jsou přítomné v řadě neonatálních tkání jako je například pupečnicková krev, tkáň pupečnickové šňůry, placenta, ale i v dospělém organismu, například v tukové tkáni, dentální dřeni, chrupavce, synoviální tkáni, kostech, kůži, játrech nebo plicích (Huber-Lang et al., 2016; Squillaro et al., 2016). Předpokládá se, že se MSC nacházejí v klidovém stavu ve specifických oblastech tkání nazývaných niky a aktivovány jsou teprve ve chvíli, kdy je potřeba tkáň obnovit, případně po poškození či zánětu. Po aktivaci MSC produkují bioaktivní molekuly, které se podílejí na modulaci nadměrně destrukční imunitní odpovědi a brání vzniku autoimunitních reakcí, ale také stimulují angiogenezi, brání fibrotizaci, napomáhají obnově struktury a funkce tkání (Caplan and Sorrell, 2015).

Migrace MSC

Zásadní otázkou buněčné terapie je cílené podání buněk přímo tam, kde jsou potřeba. Schopnost MSC migrovat do místa poškození je založena na řadě faktorů, nicméně přesné mechanismy ještě nejsou známy. MSC exprimují řadu receptorů a adhezních molekul, které zajišťují cílenou migraci, významnou roli zde hrají chemokinové receptory. Bylo prokázáno, že přítomnost CXCR4 na MSC významně zvyšuje migraci MSC do poškozeného myokardu, přičemž tento proces je možné ovlivnit přítomností jeho vazebného partneru (Zhang et al., 2008; Zhuang et al., 2009). MSC ovšem exprimují i řadu dalších chemokinových receptorů: CC receptory (CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10) a CXC receptory (CXCR4, CXCR5 a CXCR6) a navíc produkují řadu ligandů pro chemokiny (CCL2, CCL4, CCL5, CCL20, CXCL12, CXCL8, a CX3CL1), které mohou migraci MSC ovlivnit, přičemž mezi jako hlavní mediátor mobilizace a migrace MSC je uváděn CXCR4 (Honczarenko et al., 2006; Ma et al., 2014; Shi et al., 2007). Mezi další molekuly regulující migraci MSC patří integriny, zejména integrin β 1 – CD29, integrin α 4 – CD49d), ale MSC exprimují také jejich ligandy ICAM (intercellular adhesion molecule) a VCAM (vascular cell adhesion molecule-1) (Ip et al., 2007; Ren et al., 2011). Nezanedbatelný je také vliv mikroprostředí

s rozpustnými faktory v něm obsaženými, migraci ovlivňují také zánětlivé cytokiny, především faktor nekrotizující nádory α (tumor necrosis factor α – TNF- α), který zvyšuje expresi ICAM (Fu et al., 2009).

Faktory ovlivňující migraci a kultivaci MSC

Jak již bylo uvedeno, MSC je relativně snadné izolovat a dále kultivovat do množství potřebného pro aplikaci *in vivo*. Nicméně řada faktorů může v průběhu kultivace ovlivnit migrační schopnosti MSC. Jedná se především o stáří/počet pasáží MSC, přičemž čerstvé MSC disponují lepší schopností „homingu“ než dlouhodobě kultivované (Rombouts and Ploemacher, 2003). S věkem klesá schopnost organismu obnovovat poškozené tkáně a jedním z možných vysvětlení je stárnutí spojené se sníženou potencií rezidentních progenitorových buněk. Proto je pro využití v praxi žádoucí izolovat MSC z mladých jedinců, omezit počet pasáží a dodržovat vhodné podmínky kultivace. Exprese receptoru CXCR4 je po *in vitro* kultivaci významně snížena (Wynn et al., 2004), což negativně ovlivňuje migrační schopnost MSC. Přidáním některých cytokinů růstový faktor hepatocytů (HGF), interleukin - 6 (IL-6) růstový faktor kmenových buněk (SCF) a IL-3 do kultivačního média, nebo kultivace v hypoxických podmínkách může být exprese CXCR4 znovu obnovena (Shi et al., 2007; Wei et al., 2012)

Dalším významným faktorem je zdroj MSC (Bianco et al., 2008) a způsob aplikace do organismu (Paul et al., 2009). Nejčastěji využívanou metodou je intravenózní aplikace MSC, je však zdokumentováno, že značná část buněk je zachycena v plicích (Eggenhofer et al., 2012). Proto jsou testovány další metody aplikace, které jsou zaměřeny na cílové místo migrace například (intra-arteriální aplikace), ale také aplikace do peritoneální dutiny, nebo metody kdy jsou buňky kultivovány na specifických nosičích, které mohou být aplikovány přímo na místo poranění, což vede ke zlepšení terapeutického účinku MSC (Bazhanov et al., 2016; Cejka et al., 2016; Sykova et al., 2006).

Přežívání aplikovaných MSC

Další osud MSC v organismu je kontroverzní. Někteří autoři tvrdí, že po 24h již žádné živé MSC nejsou, nicméně některé práce ukazují přítomnost značených MSC i po delším čase (Eggenhofer et al., 2014; Huang et al., 2015; Lalande et al., 2011).

Díky nízké expresi MHC I, MHC II, kostimulačních molekul a neschopnosti stimulovat proliferaci T lymfocytů byly MSC dlouho považovány za neimunogenní (English et al., 2010; Uccelli et al., 2008). Současné výsledky však tento historický pohled změnil. Především bylo prokázáno, že zánětlivé prostředí dramaticky mění fenotyp MSC, zvyšuje expresi MHC I i MHC II, dalších adhezních molekul, ale i inhibičních kostimulačních molekul jako je PD-L1 a produkci imunomodulačních molekul (Krampera, 2011). Bylo také prokázáno, že MSC indukují imunologickou paměť proti alogenním MHC I a MHC II molekulám (Zangi et al., 2009).

Alogenní MSC se po aplikaci do organismu stávají cílem pro makrofágy, které po fagocytóze MSC významně mění svůj fenotyp (Song et al., 2015), ale také pro CD8+ T lymfocyty a NK buňky, které jsou schopné lyzovat jak alogenní, tak autologní MSC (Crop et al., 2011). Po intravenózní aplikaci se MSC akumulují v plicích, zde byla detekována zánětlivá odpověď, která se systémově šířila. Tento jev však paradoxně může v průběhu dalších dní navodit imunosupresivní status (Hoogduijn et al., 2013). Byl také popsán vliv způsobu aplikace na výslednou imunogenicitu MSC (Gu et al., 2015). Je tedy patrné, že vliv mikroprostředí výrazně ovlivňuje osud a funkci MSC v organismu.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem je tedy otázkou, jestli může tedy terapie, která využívá MSC, fungovat. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že MSC snižují závažnost a progresi některých onemocnění, jako je artritida (Augello et al., 2007), experimentální autoimunitní encefalomyelitida (Zappia et al., 2005), experimentální kolitida a sepse (Gonzalez-Rey et al., 2009). MSC produkují proti-zánětlivé faktory a naopak snižují produkci zánětlivých faktorů a tím ovlivňují cytokinovou síť, která je významnou platformou mezibuněčné komunikace a interakce. MSC dále exprimují povrchové molekuly s imunosupresivní funkcí, které cíleně inhibují funkci buněk imunitního systému a pomocí sekrece širokého spektra cytokinů atrahují buňky imunitního systému (Hoogduijn, 2015; Najjar et al., 2016). Bylo prokázáno, že pokud jsou MSC v přímém kontaktu s buňkami imunitního systému, vykazují silnější supresivní efekt (Di Nicola et al., 2002). MSC exprimují řadu adhezivních molekul (integrinů, ICAM-1 a -2, VCAM-1, CD72 a CD58), které zajišťují vysokoafinitní vazbu na T lymfocyty (Majumdar et al., 2003). Tato vazba je specifická a může trvat až 60 hodin (Quaedackers et al., 2009; Suva et al., 2008).

Větší význam pro imunosupresivní vlastnosti MSC je připisován produkci rozpustných faktorů. Molekul s imunosupresivní aktivitou spojených s funkčními vlastnostmi MSC bylo popsáno více než třicet. Patří mezi ně například jako je transformující růstový faktor β (TGF- β), HGF (Di Nicola et al., 2002), prostaglandinu E2 (PGE-2) (Aggarwal and Pittenger, 2005), oxid dusnatý (NO) (Sato et al., 2007), indoleamine 2,3-dioxygenáza (IDO) (Meisel et al., 2004), hem oxygenáza (HO) (Chabannes et al., 2007), růstový faktor podobný inzulinu (IGF-I) (Gieseke Blood 2007), gen stimulovaný TNF – 6 (TSG-6) (Bunnell et al., 2010), faktor inhibující leukémii (LIF) (Nasef et al., 2009; Yang et al., 2009), IL-6 (Djouad et al., 2007), lidský HLA-G5 (Selmani et al., 2008), semaforin-3A (Lepelletier et al., 2010), galektiny (Gal-1 a Gal-3) (Najar et al., 2010; Sioud et al., 2011), CD200 (Pietila et al., 2012). Významnou supresivní molekulou modulující přirozenou i adaptivní imunitu je IL-10. Ačkoliv produkce IL-10 samotnými MSC nebyla potvrzena (Gotherstrom et al., 2005), MSC prokazatelně zvyšují produkci IL-10 leukocyty a navíc řada imunoregulačních faktorů produkovaných MSC (např. HGF, PGE2, LIF) interaguje s IL-10 a zesiluje jeho supresivní účinky (Najar et al., 2016).

Mezi významné membránové molekuly zajišťující imunosupresivní vlastnosti MSC jsou udávány především PD-L1 a Fas ligand (Augello et al., 2005; Liu et al., 2004), nicméně jejich spektrum je také velmi široké, mezi významné molekuly patří například GARP, receptor pro latentní formu TGF- β , který se podílí na indukci/expanzi Treg (Carrillo-Galvez et al., 2015). Interakce receptoru Eph s molekulou Ephrin-b zvyšuje expresi regulačních faktorů jako je IDO, TGF- β a iNOS (Nguyen et al., 2013).

Je důležité připomenout, že mechanismy působení lidských a myších MSC, na kterých byla provedena většina studií, se v některých ohledech významně liší. Zatímco lidské MSC potlačují proliferaci T-lymfocytů produkcí IDO a následnou deplecí tryptofanu, u myších MSC je tato funkce zajištěna expresí indukibilní nitrit oxid syntázy (iNOS) (Meisel et al., 2011).

Působení MSC na imunitní systém

V *in vitro* studiích bylo potvrzeno, že MSC inhibují proliferaci T lymfocytů, pravděpodobně inhibicí cyklinu D2 a zvýšením exprese p27Kip1 vedoucím k zastavení buněčného cyklu, ale přesný mechanismus tohoto děje není dosud jasný (Glennie et al., 2005). MSC také indukují proti-zánětlivou populaci Treg a zesilují jejich schopnost potlačit odpověď self-reaktivních T lymfocytů, potlačují aktivaci a migraci Th17 buněk (Di Nicola et al., 2002; Melief et al., 2013; Rafei et al., 2009), zeslabují produkci protilátek (Corcione et al., 2006) a inhibují vznik a funkci dendritických buněk (DC) (Nauta et al., 2006) a žírných buněk (Brown et al., 2011). Interakce mezi MSC a NK buňkami závisí na aktivaci obou typů buněk. MSC inhibují naivní NK buňky a v přítomnosti zánětlivých cytokinů se MSC stávají k cytotoxickým účinkům NK buněk více rezistentní. Naopak pokud dojde ke kontaktu MSC a aktivovaných NK buněk, jsou MSC lyzovány (Spaggiari et al., 2006).

Supresivní účinky MSC jsou v současné době často spojovány s působením MSC na populaci monocytů/makrofágů. Prostřednictvím chemokinového spádu MSC atrahují monocyty/makrofágy do místa zánětu. Makrofágy mají významnou plasticitu a v závislosti na mikroprostředí mohou být polarizovány na klasický (M1), nebo alternativně aktivovaný (M2) fenotyp. Zatímco M1 makrofágy mají silné antimikrobiální vlastnosti, M2 potlačují zánět a podporují reparaci tkáně (Mosser and Zhang, 2008). MSC indukují přesmyk makrofágů do fenotypu M2, charakterizovaného především produkcí IL-10 a dalších trofických faktorů, zesílenou schopností fagocytózy apoptotických buněk a naopak sníženou produkcí IFN- γ , TNF a MHC II (Hajkova et al. in press, Kim and Hematti, 2009; Maggini et al., 2010).

Mezi centrální složky přirozené imunity patří také komplementový systém. Bylo prokázáno, že MSC nepodléhají lyzi zprostředkované komplementem (Komoda et al., 2010) a navíc exprimují receptory pro složky komplementu C3a a C5a, které slouží jako chemoatraktanty. Navázání těchto molekul na receptory C3aR a C5aR zvyšuje odolnost MSC vůči oxidativním radikálům (Schraufstatter et al., 2009). V místě zánětu nebo poranění vzniká velké množství obou těchto molekul, které pomáhají migraci MSC a podporují tak potřebnou regeneraci tkáně.

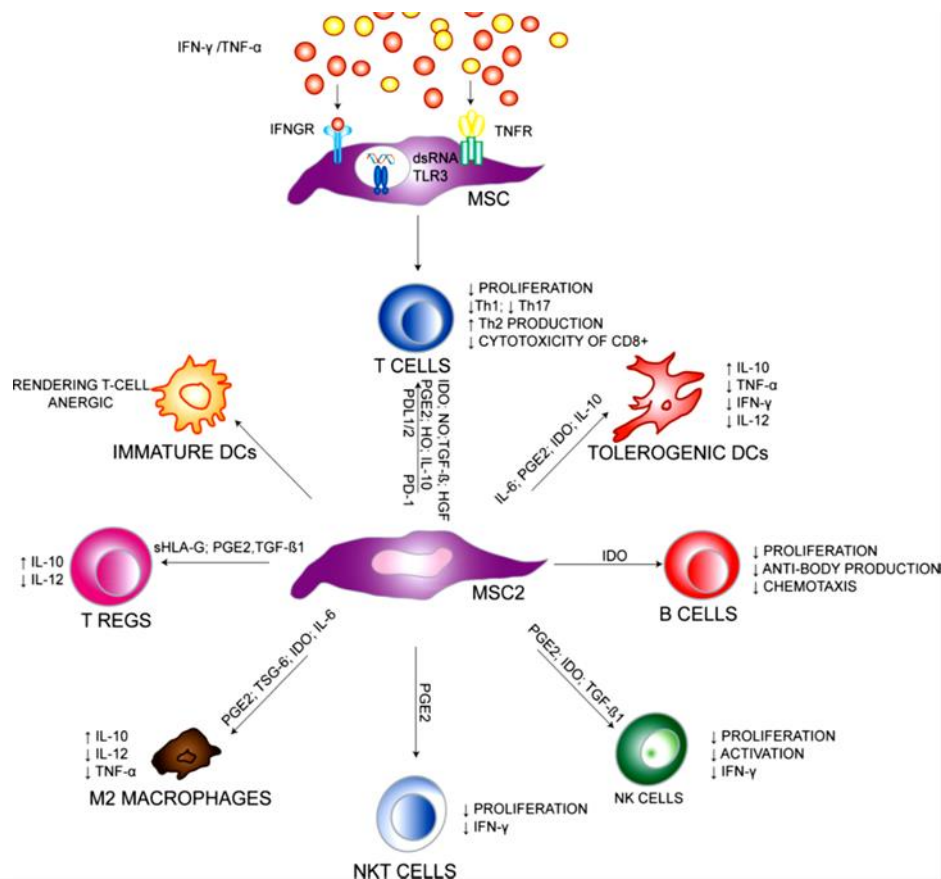
Přesto, že exprimují jen nízké hladiny MHC I, jsou MSC schopné prezentovat antigen a tudíž zahájit imunitní odpověď. Navíc se v přítomnosti zánětlivých stimulů, například IFN- γ , indukuje exprese MHC II na povrchu MSC a tak i jejich schopnost zpracovat a následně prezentovat antigen CD4+ T lymfocytům (Romieu-Mourez et al., 2007). MSC mohou iniciovat také odpověď CD8+ lymfocytů zpracováním antigenu v proteazomu a mechanismem kros-prezentace pomocí MHC I molekuly (Francois et al., 2009).

MSC mají také schopnost fagocytózy. Tso et al. (2010) ukázali, že za patologických podmínek indukované artritidy v průběhu osteogenní diferenciace MSC fagocytují apoptotické buňky, díky zvýšení exprese CXCR4 migrují do zánětlivých kloubů a zde indukují expresi Th17 buněk.

Byla prokázána také antimikrobiální aktivita MSC, které po kontaktu s bakteriemi (gram-pozitivními i gram-negativními) začnou produkovat antimikrobiální peptidy, především LL37 (Krasnodembskaya et al., 2010). Navíc zesilují produkci IFN- γ , TNF- α , IL-6, MCP-1, NO a PGE-2 a podporují schopnost makrofágů zabít bakterie (Kim et al., 2016). Významným účastníkem antimikrobiální imunity jsou neutrofilové. Bylo prokázáno, že MSC produkují faktory, které snižují expresi pro-apoptotických molekul a zesilují schopnost oxidativního vzplanutí neutrofilů (Brandau et al., 2010; Cassatella et al., 2011).

Mikroby jsou rozpoznávány pomocí receptorů označovaných jako PPR, které rozpoznávají specifické znaky spojené s patogeny nebo endogenní signály nebezpečí. Mezi ně patří skupina toll-like receptorů (TLR), jejichž exprese byla potvrzena také na povrchu MSC (Pevsner-Fischer et al., 2007). Podobně jako v případě C3a a C5a stimulace přes TLR chrání MSC před oxidativním stresem, přičemž exprese některých TLR je zvýšena v zánětlivých podmínkách nebo při hypoxii (Cho et al., 2006; Lombardo et al., 2009; Raicevic et al., 2010). Důležité je, že aktivace přes TLR nezvyšuje imunogenicitu MSC (Raicevic et al., 2010) a nebrání tak využití imunologicky privilegovaných MSC v klinické praxi. Stimulace přes MSC ale ovlivňuje imunoregulační funkci MSC. Zvyšuje jejich migrační schopnost (Tomchuck et al., 2008), sekreci proteinů podílejících se na supresivní funkci MSC, jako je galektin 3 nebo IL-6 (Sioud et al., 2010).

Vazba na různé TLR má odlišné imunomodulační efekty. Na základě těchto efektů byl navržen model polarizace MSC na dva odlišné fenotypy. Krátkodobá stimulace přes TLR3 vede ke zvýšené expresi IDO, COX2 a IL-4, zatímco po aktivaci přes TLR4 jsou produkovány mediátory jako je IL-6, IL-8 a TGF- β , které vedou ke vzniku pro-zánětlivých buněčných populací. MSC jsou tak obdobně jako makrofágy děleny do dvou fenotypů MSC1 a MSC2 (Waterman et al., 2010). Je možné předpokládat, že populace MSC1 se podílí na antimikrobiální odpovědi, zatímco při dlouhodobém zánětu vzniká po aktivaci přes TLR3 populace MSC2, která se podílí na potlačení zánětu a regenerace tkáně (Le Blanc and Mougiakakos, 2012). Různé fenotypy MSC mohou mít také odlišný vliv na růst nádorů (Waterman et al., 2010).



Obr. 2 Imunosuprese pomocí MSC (Gazdic et al., 2015)

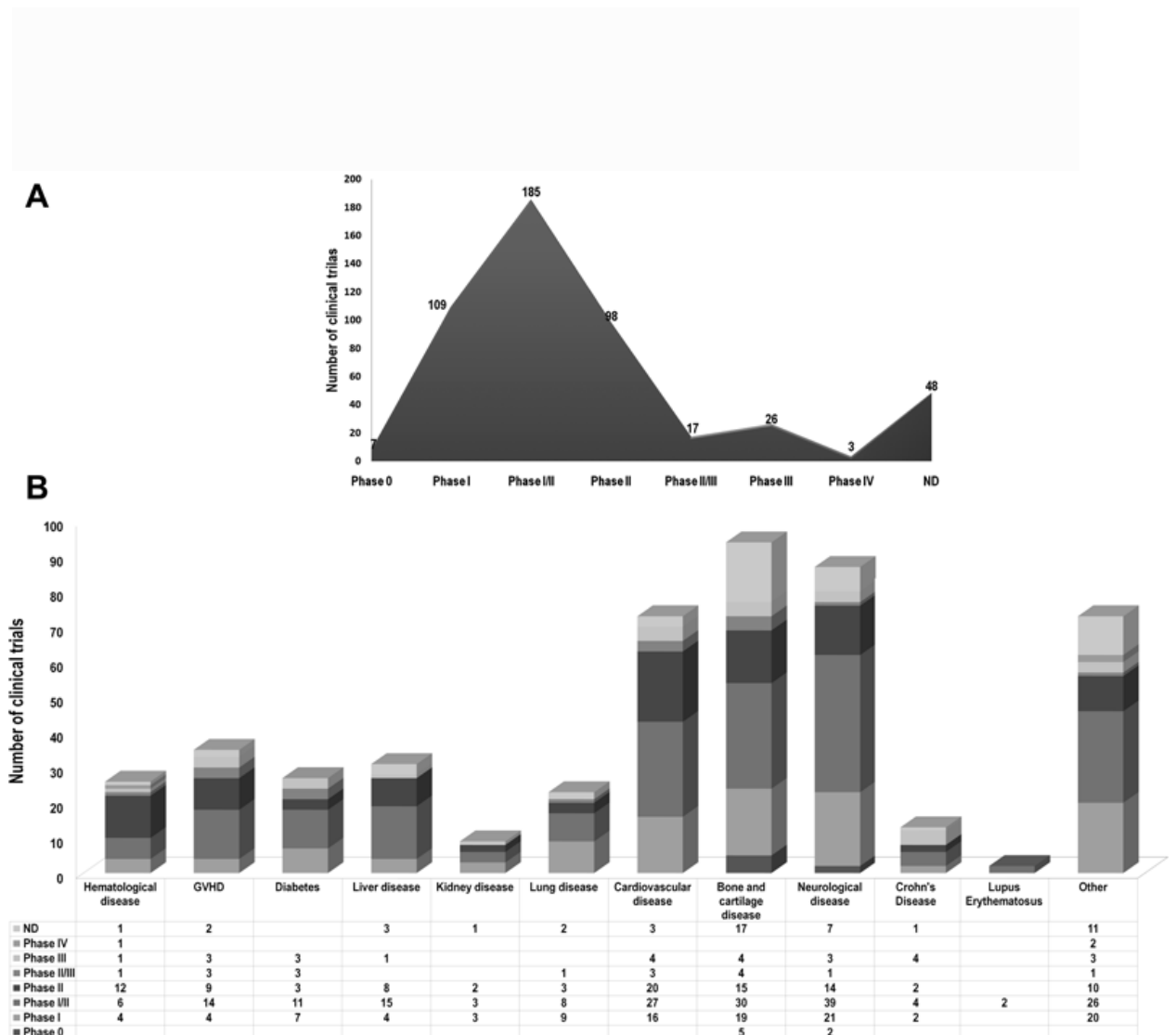
MSC a buněčná terapie

V roce 1995 byla poprvé využita transplantace buněk kostní dřeně u pacientů s non-Hodgkinovým lymfomem (Lazarus, 1995). O pět let později proběhla první klinická studie využívající MSC na podporu krvetvorby, kdy MSC autologní s hematopoietskými kmenovými buňkami (HSC) byly aplikovány pacientce, která v rámci léčby rakoviny prsu dostávala vysoké dávky chemoterapie (Koc et al., 2000). Od té doby proběhla a nadále probíhá řada studií o využití MSC pro terapii celé řady chorob, například reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), orgánových transplantací, neurologických onemocnění, chorob plic a srdce, gastrointestinálních onemocnění, poškození oka a terapii hlubokých kožních poranění a defekty kostí a chrupavek (Squillaro et al., 2016). V žádné z doposud prováděných studií nebyly potvrzeny negativní efekty aplikace MSC. Nicméně dlouhodobá bezpečnost terapií založených na působení MSC musí být potvrzena a je prozatím zásadním limitem využití MSC v klinické praxi. Proto je také většina současných klinických studií v časných fázích (I, I/II nebo II) klinického výzkumu (viz obr. 3).

Jak již bylo zmíněno, terapeutické působení je založeno na diferenciačním i transdiferenciačním potenciálu MSC, jejich schopnosti produkovat parakrinní faktory, imunomodulačním potenciálu a možnosti migrovat do místa zánětu. Je pravděpodobné, že případné léčebné účinky MSC jsou založeny na kombinaci všech těchto mechanismů a budou zastoupeny v různé míře v závislosti na prostředí, ve kterém se MSC nacházejí.

Terapie GVHD

V klinické praxi byly MSC využity nejdříve pro terapii GVHD. Tato silná reakce spojená s vysokou mortalitou je stále závažným limitujícím faktorem po transplantacích kostní dřeně. Výsledky studií využívajících MSC pro profylaxi GVHD jsou částečně kontroverzní. Některé studie vykazovaly snížení počtu GVHD při ko-transplantaci HSC a MSC (Baron et al., 2010; Lazarus et al., 2005). Recentní studie však nepotvrdila statistickou signifikanci působení MSC (Kuzmina et al., 2012). Naopak jako efektivní se ukázala aplikace MSC v terapii akutní GVHD. Několik studií potvrdilo významné zvýšení úplného, případně částečného zotavení z GVHD. (Kurtzberg et al., 2014; Le Blanc et al., 2008; Le Blanc et al., 2004). Aplikace MSC působí také na chronickou GVHD, i když odlišnými mechanismy (Peng et al., 2014).



Obr. 3

493 klinických studií založených na MSC rozdělených podle (A) fáze studie (B) fáze studie a typu onemocnění. Data získána z www.clinicaltrial.gov (Squillaro et al., 2016).

Terapie kardiovaskulárních onemocnění

V západním světě patří kardiovaskulární onemocnění k nejčastějším příčinám úmrtí. Na rozdíl od některých nižších obratlovců nemají lidé schopnost přirozené regenerace, poškození kardiomyocytů vyvolává poruchy kontrakce srdce a mrtvé kardiomyocyty jsou nahrazeny fibroblasty, které formují jizvy. Proto jsou intenzivně studovány možnosti funkční obnovy poškozené tkáně. Jedním z přístupů je buněčná terapie využívající MSC.

Mezi roky 2010 – 2015 bylo provedeno 41 klinických studií testujících využití MSC pro léčbu a obnovu poškozeného srdce. Většinou zahrnují fázi II klinických testů a zaměřují se na způsob podání MSC, případně srovnávají vliv aplikace autologních/alogenických MSC

a samozřejmě také bezpečnost a účinnost podaných MSC (Singh and Sen, 2016). Vzhledem k významně vyšší efektivitě lokálně podávaných buněk jsou MSC aplikovány ve většině studií intrakoronárně, případně intrakardiálně. Autologní i alogenní MSC prokázaly stejný regenerační potenciál (Hare et al., 2012). Většina studií vykazuje pozitivní vliv MSC a popisuje zlepšení funkce a rychlejší regeneraci poškozeného srdce (Friis et al., 2011; Kastrup et al., 2009; Katritsis et al., 2005). Některé experimentální studie na zvířatech však poukázaly na závažné vedlejší efekty, jako je růst nádorů (Jeong et al., 2011) nebo tvorba enkapsulovaných struktur osahujících osifikované a kalcifikované fragmenty (Breitbach et al., 2007). I když podobné účinky nebyly v klinických studiích potvrzeny, je potřeba mít nežádoucí vedlejší účinky na paměti.

Terapie kloubních onemocnění

Klouby se skládají z tkání převážně mezenchymálního původu, a proto není překvapením, že se MSC nacházejí v synoviální tekutině i pevné tkáni kloubu. Jejich funkce zde však prozatím není jasná. Pravděpodobně slouží jako zdroj buněk zajišťujících opravu poškozené tkáně, případně mohou být odpovědné za potlačení zánětu (Kristjansson and Honsawek, 2014). Vzhledem ke schopnosti osteogenní a chondrogenní diferenciaci patří výzkum využití MSC v oblasti léčby tkáně chrupavky a kostí k nejčastějším klinickým studiím týkajících se MSC.

Osteoartritida (OA) je choroba, při které dochází k degeneraci kloubní chrupavky, která ztrácí mechanické vlastnosti, což následně vede k zánětlivé a velmi bolestivé reakci. OA patří k onemocněním s celosvětově nejrychleji rostoucím počtem případů, v současnosti byla diagnostikována u více než 250 milionů lidí (Silverwood et al., 2015).

Od roku 2010 probíhají klinické studie využívající MSC (Kristjansson and Honsawek, 2014), přičemž mezi nejvýznamnější patří práce, ve které byla 12 pacientům neodpovídajícím na konzervativní léčbu aplikována dávka MSC. Tito pacienti sledovaní po dobu 1 roku vykazovali rychlé a progresivní zlepšení funkčních vlastností včetně zlepšení kvality chrupavky (Orozco et al., 2013).

V současnosti probíhá více než 30 klinických studií využívajících MSC pro léčbu OA, pro rozšíření do běžné klinické praxe je však nezbytné, stejně jako u všech dalších terapií, zjistit optimální zdroj, kultivaci, uchování a aplikaci MSC.

Zajímavá je možnost využití MSC pro terapii Ostogenesis imperfekta (OI), známé jako nemoci křehkých kostí. OI je genetické onemocnění způsobené dominantní mutací genu pro kolagen typu I a je charakterizovaná osteopenií, četnými zlomeninami a závažnými deformitami kostí. V současnosti na OI není lék a proto možnost využití MSC dává naději řadě pacientů. První klinické studie v této oblasti prokázaly, že alogenní MSC aplikované dětským pacientům se závažnou formou OI je možné detekovat v kůži, kostech a kostní dřeni. 6 měsíců po infuzi byl navíc u pacientů prokázán zrychlený růst (Horwitz et al., 2002). Dalším krokem k léčbě byla intrauterinní transplantace MSC. Bylo prokázáno, že alogenní MSC od mužského dárce i přes HLA inkompabilitu, jsou schopné diferencovat do buněk kostí a narozená dívka nevykazovala imunoreaktivní reakci proti dárci a v rámci léčby dostávala v dalších letech infuze MSC od stejného dárce (Le Blanc et al., 2005). Na stejném pracovišti proběhly i další intrauterinní transplantace a pacienti byli dlouhodobě sledováni (do 8 let věku pacientů) s podobně nadějnými výsledky (Gotherstrom et al., 2014).

Terapie dalších onemocnění

MSC byly také využity v léčbě poškození plic (Savukinas et al., 2016), ledvin (Griffin et al., 2016; Yang et al., 2016), jater (Owen and Newsome, 2015) a různých autoimunitních onemocnění, jako jsou idiopatické střevní záněty, systémový lupus erytematos, systémová sklerodermie, roztroušená skleróza, amyotrofická laterální skleróza a další (Duran and Hommes, 2016; Llufríu et al., 2014; Munir and McGettrick, 2015; Petrou et al., 2016; Tyndall and van Laar, 2016).

MSC a transplantace

Imunitní systém pacienta rozpozná alogenní antigeny transplantovaného orgánu a bez celoživotní imunosupresivní léčby hrozí odhojení štěpu. Dlouhodobé podávání imunosupresiv však přináší řadu nežádoucích vedlejších efektů (jako je zvýšené riziko infekcí, vzniku nádorů, nefrotoxické efekty, otoky a zvýšení krevního tlaku) a prozatím nebyly nalezeny látky schopné potlačit chronickou rejekci. Díky svému imunosupresivnímu působení mají MSC potenciál zvýšit přežití transplantovaných tkání, snížit koncentraci použitých imunosupresivních látek, což by vzhledem k tomu, že

nežádoucí účinky jsou přímo úměrné dávce podávaných imunosupresiv, přineslo významný posun v transplantační medicíně.

V současnosti probíhá několik klinických studií zaměřených především na transplantaci ledvin a jater. Bylo prokázáno, že použití MSC je bezpečné a použité alogenní buňky jsou dobře tolerovány (Peng et al., 2013). Získané výsledky indikují, že MSC brání rozvoji akutní buněčné rejekce, umožňují snížení množství podávaných imunosupresivních látek a napomáhají dlouhodobé funkci štěpu (Perico et al., 2011; Tan et al., 2012). MSC dále modulují systémovou odpověď proti aloantigenům, snižují proliferaci periferních mononukleárních buněk (Reinders et al., 2013) a zvyšují počet Treg (Perico et al., 2011).

Transplantace kůže

MSC mohou podpořit přijetí a funkci kožního štěpu pomocí řady mechanismů - schopností diferenciací (Sasaki et al., 2008), potlačením zánětlivých reakcí (Chen et al., 2009; Kim et al., 2013; Rasulov et al., 2006) a produkcí růstových faktorů, které ovlivňují růst, migraci a diferenciaci řady buněčných typů, včetně angiogeneze (Li et al., 2015). MSC také potlačují vznik jizev (Li et al., 2015; Stoff et al., 2009) a svými antimikrobiálními vlastnostmi brání rozvoji infekce (Mei et al., 2010). Již v roce 2002 prokázala Amelia Bartholomew, že aplikace MSC prodlužuje přežití kožního štěpu u pavíánů (Bartholomew et al., 2002). My jsme prokázali vliv MSC na populaci makrofágů infiltrující kožní štěp (Hájková et al. 2015). Současné práce se věnují spíše vlivu MSC na hojení kožních poranění (Hanson et al., 2016; Li et al., 2015) a fibrotických onemocnění kůže (Maria et al., 2016), případně na transplantaci kompozitních tkání, tedy transplantátu složeného z kůže, svalů, nervů, tuku a cév, kde MSC podporují přežívání štěpů, stimulují regeneraci periferních nervů, zpomalují ischemicko-reperfúzní poranění a zlepšují hojení rány (Schweizer et al., 2015).

Nově uvažovanou strategií, která vyřeší problémy s imunogenicitou MSC je aplikace exozomů izolovaných z MSC, u kterých byla prokázána významná imunomodulační aktivita a schopnost navodit specifickou toleranci vůči alo-antigenům (Monguijo-Tortajada et al., 2015), případně kondiciovaného média z MSC nebo jiných tkání (Kober et al., 2016).

Dalším významným konceptem je aktivace endogenních kmenových buněk, které budou zlepšovat regeneraci tkání bez nutnosti izolace, manipulace a aplikace exogenních MSC (Mele et al., 2016).

Poškození oka

Rohovka je průhledná vrstva na povrchu oka. Její obnova je zajištěna limbálními kmenovými buňkami (LSC) lokalizovanými v bazální vrstvě limbu, struktury nacházející se na okraji rohovky. V případě poškození rohovky jsou LSC aktivovány, migrují do rohovky a zde diferencují do terminálních epitelálních buněk a nahrazují poškozenou povrchovou vrstvu rohovky (Dua and Azuara-Blanco, 2000). Pokud je ovšem poškození velké, dochází k angiogenezi a infiltraci buněk imunitního systému a rozvoji patologických procesů. V případě poškození limbu a ztrátě LSC nemůže být povrch rohovky obnoven, což v konečném důsledku vede ke slepotě (Pellegrini et al., 2009). V takovém případě je jediným možným řešením transplantace rohovky i limbu. Vzhledem k imunologické privilegovanosti oka je míra úspěšnosti u transplantace rohovky vysoká, v normálních nerizikových případech, v 80% případů přesahuje přežívání štěpů 5 let. U rizikových situací jako jsou pre-operační zánětlivé stavy a preformované prokrvení, dochází k odhojení transplantované rohovky a každá následná retransplantace je potom více komplikovaná (Nieder Korn, 2010).

Relativně malý počet klinických studií je zaměřen na léčbu očních onemocnění pomocí MSC. Byla ovšem provedena řada prací využívajících zvířecích modelů pro studium možností léčby retinopatie, uveitidy, glaukomu a poškození povrchu oka. (Zhang et al., 2015). Výhodou studií vlivu MSC na poškození rohovky je imunologická privilegovanost oka a lokalizace rohovky na povrchu oka a její transparentnost, která umožňuje zhodnocení terapeutické účinnosti podaných buněk. V literatuře jsou popsány výsledky studující vliv podávaných MSC na terapii vrozených očních defektů, chemicky poškozené i transplantované rohovky (Li and Zhao, 2016; Zhang et al., 2015).

Myši s deletovaným genem pro lumikan slouží jako model pro vrozená onemocnění spojená se zakalením rohovky a poruchami uspořádání kolagenu. Lidské MSC po aplikaci do rohovky přežívaly více než 3 měsíce. Navíc po transplantaci těchto buněk došlo ke snížení opacity a reorganizaci stromatu rohovky (Liu et al., 2010). Podobné výsledky byly

dosaženy na modelu mukopolysacharidózy VII, poruchy aktivity lysozomálních enzymů (Coulson-Thomas et al., 2013).

K nejčastějším patří poškození rohovky chemickými látkami nebo teplem. Dochází k porušení imunologicky privilegovaného prostředí a rozvoji zánětlivé reakce. Možnost regenerace poškozené rohovky závisí v tomto případě především na míře poškození. Podání MSC po chemickém poškození potlačí zánětlivou reakci a neovaskularizaci (Javorkova et al., 2014; Oh et al., 2008; Yao et al., 2012). Tyto a další studie jasně ukázaly, že pro dosažení optimálních výsledků není nezbytné aplikovat MSC do poraněné tkáně, intravenózně podané MSC jsou schopné migrovat do místa poškození (Lan et al., 2012; Roddy et al., 2011). Nicméně v případě povrchových tkání se tato možnost nabízí. MSC mohou být přeneseny na amniové membráně, nanovláčkových nosičích, nebo pomocí fibrinového gelu (obr. 4). Některé studie prokázaly schopnost MSC exprimovat znaky epiteliálních rohovkových buněk (Reinshagen et al., 2011; Trosan et al., 2016).

Podávání MSC po transplantaci rohovky však nepřineslo jasné výsledky. Především doba podání MSC (před/po) transplantaci se ukázala být významným faktorem. Vyšší účinnost pre-operativního podání je přisuzována navozením tolerance především díky expanzi Treg (Casiraghi et al., 2008), nebo potlačení rozvoje zánětu (Oh et al., 2012). Naopak na modelu alogenní transplantace rohovky u potkanů došlo k prodloužení přežívání štěpu, pouze pokud byly MSC aplikovány těsně po operaci a pre-operativní podání nemělo vliv (Jia et al., 2012). Také lokální i i.v. podávání MSC izolovaných z tukové tkáně v čase před, nebo po transplantaci, nevedlo k oddálení rejekce štěpu v modelu alo- i xeno-genní transplantace rohovky u králíka. Naopak vedlo ke zvýšení zánětlivé reakce a neovaskularizace (Fuentes-Julian et al., 2015).

I v případě léčby poškozeného oka platí, že je nezbytné další studium molekulárních mechanismů působení MSC, stejně jako dalších faktorů, které mohou ovlivnit terapeutické působení MSC.

Dalším faktorem, který je potřeba při terapeutickém podávání MSC vzít do úvahy, je fakt, že MSC jsou v řadě případů podávány společně s imunosupresivními látkami. Výsledky dosavadních studií interakce imunosupresiv a MSC nejsou konzistentní. MSC podávané v kombinaci s imunosupresivní látkou mykofenolát meofetil (MMF) prodloužily přežívání štěpu (Eggenhofer et al., 2011; Popp et al., 2008), nadějně výsledky

byly získány také při aplikaci MSC spolu s Rapamycinem (Ge et al., 2009). Ačkoliv na modelu transplantace srdce nebylo potvrzeno synergistické působení inhibitorů kalcineurinu a MSC (Eggenhofer et al., 2011), naše výsledky získané na modelu transplantace kožního štěpu a lokálním podání MSC na nanovlákněném nosiči s inkorporovaným CsA vedly k významnému supresivnímu účinku (Hájková et al. 2015). Synergistické působení CsA a MSC bylo prokázáno také na modelu transplantace rohovky (Jia et al., 2012). Vzhledem k možnému pozitivnímu/negativnímu ovlivnění účinků imunosupresivní léčby při kombinovaném podávání s MSC je nesmírně důležité před zavedením MSC do klinické praxe tuto oblast blíže prostudovat.

Shrnutí

Data získaná z in vitro pokusů a pre-klinických modelů ukazují, že MSC působí inhibičně na aktivované buňky imunitního systému. Přestože mechanismus působení není zcela znám, mohou MSC významně přispět v terapii řady onemocnění. Před použitím v klinické praxi je však nezbytné najít vhodný způsob izolace, kultivace a aplikace MSC včetně nastavení časového režimu podávání. Dále je důležité zjistit vliv heterogenity dárců, expanze MSC ex vivo, imunogenicity a možných tumorigenních vlastností MSC. Terapie pomocí MSC není vhodná pro všechna onemocnění spojená s imunitním systémem, proto musí být klinické testy striktně regulované. Důležitým úkolem blízké budoucnosti pro vědce i lékaře je zjištění mechanismů ovlivňujících terapeutické využití MSC.

Shrnutí vybraných publikací

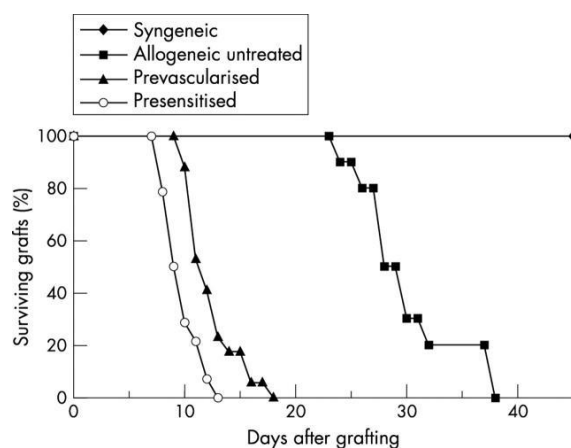
V laboratoři transplantační imunologie jsme se zabývali imunologickými mechanizmy transplantační tolerance s cílem prodloužit přežití transplantátu. Původním modelem byla transplantace kůže. Vzhledem k tomu, že kůže funguje jako ochrana před průnikem patogenů do organismu je zde vysoká aktivita buněk imunitního systému. Proto je rejekční reakce v kůži velmi silná, transplantované štěpy přežívají jen omezenou dobu a pro prodloužení jejich přežití je potřeba razantních imunosupresivních zásahů. Ve spolupráci s prof. Filipcem z Oční kliniky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy byl zaveden model orthotopické transplantace myší rohovky. Vzhledem k transplantaci tkáně do imunologicky privilegovaného místa, je přežití štěpu i bez použití imunosupresivní terapie delší a umožňuje jemnější modulaci imunitního systému. Původním cílem tohoto projektu bylo studium transplantační reakce v imunologicky privilegovaném místě, nicméně velmi brzy se ukázalo, že vytvořený model je vhodným také pro studium kmenových buněk v oku a jejich případné využití v terapiích zánětlivých reakcích v oku, případně regeneraci poškozené rohovky.

Prevention of corneal allograft rejection in a mouse model of high risk recipients (Vitova et al., 2004)

Model ortotopické transplantace rohovky u myší přináší řadu výhod pro studium transplantačních reakcí, vzhledem k imunologické privilegovanosti oka přežívá až 50% alo-transplantátů bez jakékoliv imunosupresivní léčby. Naopak lze připravit pre-senzitizované rizikové jedince, u kterých jsou všechny alogenní transplantované rohovky odhojeny. V této studii jsme se zaměřili na efektivitu podávání běžně využívaných imunosupresivních látek a protilátek proti T lymfocytům.

Prokázali jsme, že u rizikových příjemců transplantátu je pro prevenci odhojení alogenních štěpů významně účinnější podávání protilátky proti CD4, než anti-CD8 mAb, imunosupresivních látek - mykofenolát mofetilu (MMF) a cyklosporinu A (CsA), nebo dokonce kombinovanému podání těchto látek. Nicméně úspěšnost léčby je závislá především na stavu transplantovaného oka, u pre-senzitizovaných příjemců nebyl účinný žádný typ léčby. Tato práce ukázala možnost studia transplantační reakce a možnosti

jejího ovlivnění na myším modelu, který je relativně dostupný a vzhledem k využití definovaných kmenů myší umožňuje provádět reprodukcibilní experimenty.



Model transplantace rohovky u myší

Přežívání syngenního transplantátu, a alogenních transplantátů u neovlivněných myší nebo myší s navozenou prevaskularizací oka, případně presenzitizovaných aplikací antigenů dárce.

A rapid separation of two distinct populations of mouse corneal epithelial cells with limbal stem cell characteristics by centrifugation on Percoll gradient (Krulova et al., 2008)

V době expanzivního rozvoje poznatků o kmenových buňkách jsme se zaměřili na možnou přítomnost tohoto typu buněk v povrchových strukturách oka. Rohovka a navazující limbus jsou v přímém kontaktu s okolním prostředím, které přináší značnou možnost poškození povrchu oka. Je proto logické, že se zde nacházejí buňky schopné podpořit regeneraci povrchu oka a zajistit tak zachování zraku, jako jednoho z nejdůležitějších smyslů.

Potvrdili jsme přítomnost kmenových buněk v limbu - povrchová struktura oka zajišťující regeneraci povrchu oka. Pomocí perkolového gradientu jsme získali 2 různé populace buněk vykazujících vlastnosti kmenových buněk, charakterizovaných přítomností znaků kmenových buněk (ABCG2 Lgr5) a přítomností tzv. „side population“ (SP). Tyto dvě populace se lišily velikostí a granularitou, schopností proliferace na živné vrstvě 3T3 buněk. Z rozdílů v expresi diferenciačního znaku keratinu 12 (K12) a

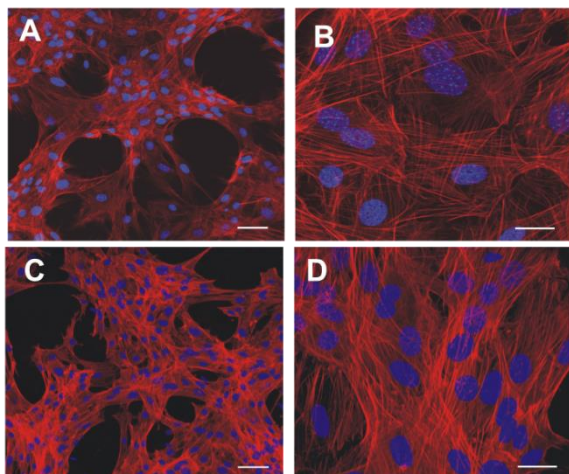
transkripčního faktoru p63 vyplývá pravděpodobný rozdíl ve vývojovém stádiu těchto populací, přičemž populace K12-p63⁺ je bližší primitivnímu fenotypu kmenových buněk.

V této práci jsme především prokázali možnost izolovat kmenové buňky z limbu na základě velikosti/hustoty. Tuto metodiku jsme nadále využívali v řadě dalších prací, ve které byla studována funkce a vlastnosti těchto buněk.

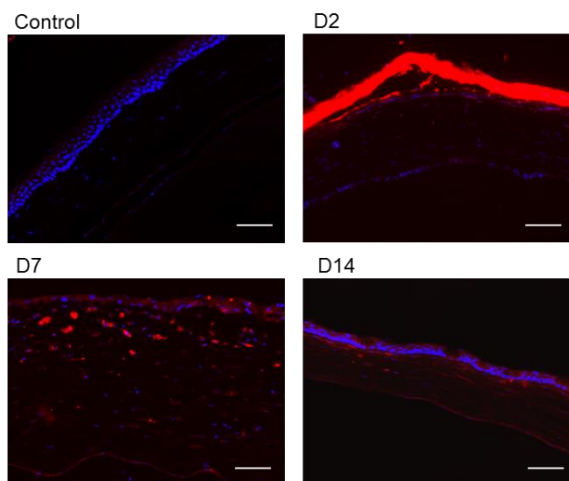
Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds (Zajicova et al., 2010)

S přibývajícimi poznatky o regeneračních a supresivních schopnostech MSC se ukázala možnost jejich využití pro regeneraci poškozeného povrchu oka. V této době již bylo potvrzeno, že intravenózně aplikované MSC jsou zachyceny především v plicích, proto jsme využili možnost, kterou nabízí oko jako povrchová struktura a studovali jsme možnost přenosu kmenových buněk pomocí nanovláknenných nosičů. Výhodou nanovláken je, že mohou být připraveny z celé řady sloučenin, je tedy možné připravit materiály kompatibilní s lidskými tkáněmi, s definovanou strukturou, porozitou a plošnou hmotností a tyto materiály dále modifikovat například inkorporací dalších chemicky aktivních látek.

V této práci jsme popsali schopnost růstu limbálních kmenových buněk (LSC) a MSC na nanovláknenném nosiči připraveném z polyamidu 6/12 (PA6/12), který je stabilní ve vodném prostředí a biokompatibilní. Morfologie, růstové vlastnosti a životnost LSC i MSC rostoucích na nanovláknenném nosiči PA6/12 byly srovnatelné s buňkami rostoucími na plastovém povrchu. Pomocí nanovláknenných nosičů jsme přenesli LSC a MSC označené fluorescenční barvou na povrch poškozeného oka. Přenesené buňky v tomto modelu prokázali schopnost inhibice lokální zánětlivé reakce a podpory hojení. Tento typ nanovláken tak reprezentuje vhodný nosič pro využití v léčbě deficitu kmenových buněk a různých poškození oka.



Morfologie LSC rostoucí na plastovém povrchu (A,B) a na nanovlákněch PA6/12 (C,D). (A, C) 50 μm ; (B, D) 20 μm .



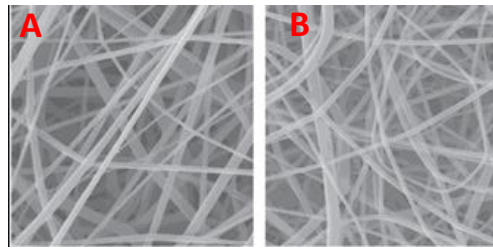
Detekce aplikovaných na poškozený povrch oka na nanovlákně PA6/12, 2, 7 a 14 dní po aplikaci

Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression (Holan et al., 2011)

V další práci jsme využili možností modifikovat nanovlákněné nosiče. CsA je v klinické praxi široce využívaná imunosupresivní látka, rozpustná ve vodě a nabízející „výhodné“ vlastnosti pro inkorporaci do nanovlákně. Takto upravený nosič je potom využitelný v celé řadě klinických aplikací, především potom v léčbě zánětlivých povrchových defektů.

Testovali jsme nanovlákně připravená z kyseliny L- poly mléčné (PLA) v kombinaci s CsA. Prokázali jsme, že proces zvláknění neovlivnil farmakologickou aktivitu a schopnost CsA uvolnit se do vodného prostředí. Po lokální aplikaci nanovlákně na kožní štěp uvolňování probíhalo pomaleji, po 8 dnech bylo v nosiči detekováno ještě 35% původní koncentrace CsA. Po aplikaci nosiče na alogenní kožní štěp navíc došlo ke snížení lokální produkce prozánětlivých cytokinů (IL-2, IFN- γ a IL-17). Tyto výsledky prokázaly, že nanovlákně s inkorporovaným CsA mohou sloužit jako efektivní nosiče buněk a zároveň se podílet na potlačení zánětlivé reakce.

Výsledky této práce mají nesmírný význam pro přenos do klinické praxe. O využití nosičů vhodných pro buněčnou léčbu je v odborné veřejnosti značný zájem. Modifikace imunosupresivní látkou přináší velké výhody, vzhledem k tomu, že tyto látky se uvolňují samovolně a průběžně a odpadá tak nutnost opakovaných aplikací.



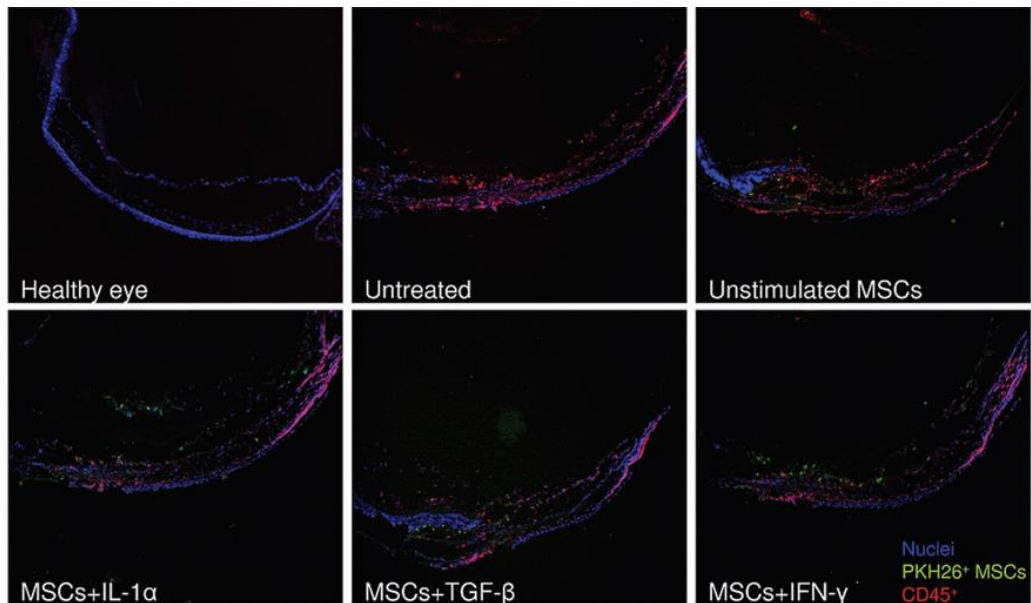
PLA nanovlákná zobrazená pomocí elektronového mikroskopu
A - 0% CsA, B -1 wt.% CsA. zvětšení: 5000×.

Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon-gamma-treated mesenchymal stromal cells (Javorkova et al., 2014)

Další studie působení MSC jsme prováděli na modelu oka poškozeného poleptáním. Konvenčně využívané terapie poleptaného oka zahrnují především snahu potlačit zánětlivou reakci a neovaskularizaci pomocí imunosupresivních látek, následované transplantací rohovky, případně rohovky i limbu. Takto poškozené oko však představuje extrémně rizikovou situaci pro transplantaci s relativně nízkým procentem přežívajících transplantátů. Proto je nezbytné vyvinout alternativní terapie, které účinněji zabrání nežádoucím zánětlivým reakcím. V současnosti se využívá přenosu limbálních buněk na různých nosičích. Další nadějnou alternativou jsou kmenové buňky, které nabízejí možnost diferenciaci do rohovkového epitelu a zejména schopnost modulace zánětlivé odpovědi. Naše výsledky získané na myším modelu tyto předpoklady potvrzují.

Poškození oka bylo navozeno poleptáním louhem a MSC získané z kostní dřeně byly podávány 24h po poškození. Pro srovnání vlivu cytokinového prostředí na migrační a supresivní schopnosti MSC byly buňky před podáním kultivovány v přítomnosti IL-1 α , TGF- β nebo IFN- γ . Prokázali jsme, že MSC specificky migrují do poškozeného oka, počet značených MSC byl v poškozeném oku 3 dny po poleptání třicetkrát vyšší než v kontrolním, nepoškozeném oku. Studium zánětlivé reakce prokázalo, že přítomnost MSC snižuje počet infiltrujících lymfoidních i myeloidních buněk. Ale pouze MSC

kultivované v přítomnosti IFN- γ měly významný efekt na populaci myeloidních buněk, snižovaly hladiny zánětlivých cytokinů a NO v poškozeném oku a potlačovali tak rozvoj akutní fáze zánětlivé reakce. Výsledky této práce tedy navozují otázku ovlivnění MSC před aplikací pacientovi, které může významně změnit jejich migrační i supresivní vlastnosti.



Imunofluorescenční značení kryožezů z kontrolních myší a myší, kterým byly podávány nestimulované MSC a MSC stimulované IL-1 α , TGF- β , nebo IFN- γ . Reprezentativní obrázky

The supportive role of insulin-like growth factor-I in the differentiation of murine mesenchymal stem cells into corneal-like cells (Trosan et al., 2012)

Otázkou, která se vzhledem k léčbě poškozeného povrchu oka pomocí MSC nabízí, je jejich schopnost diferenciaci do buněk rohovkového epitelu. Obecně je možnost diferenciaci MSC v buňky cílové tkáně často diskutovaná a názory odborné veřejnosti nejsou zcela jednotné. Naše výsledky prokázaly možnost diferenciaci kmenových buněk získaných z kostní dřeně do buněk, charakterizovaných přítomností rohovkového epitelu i keratinocytů, ale i vlastností MSC.

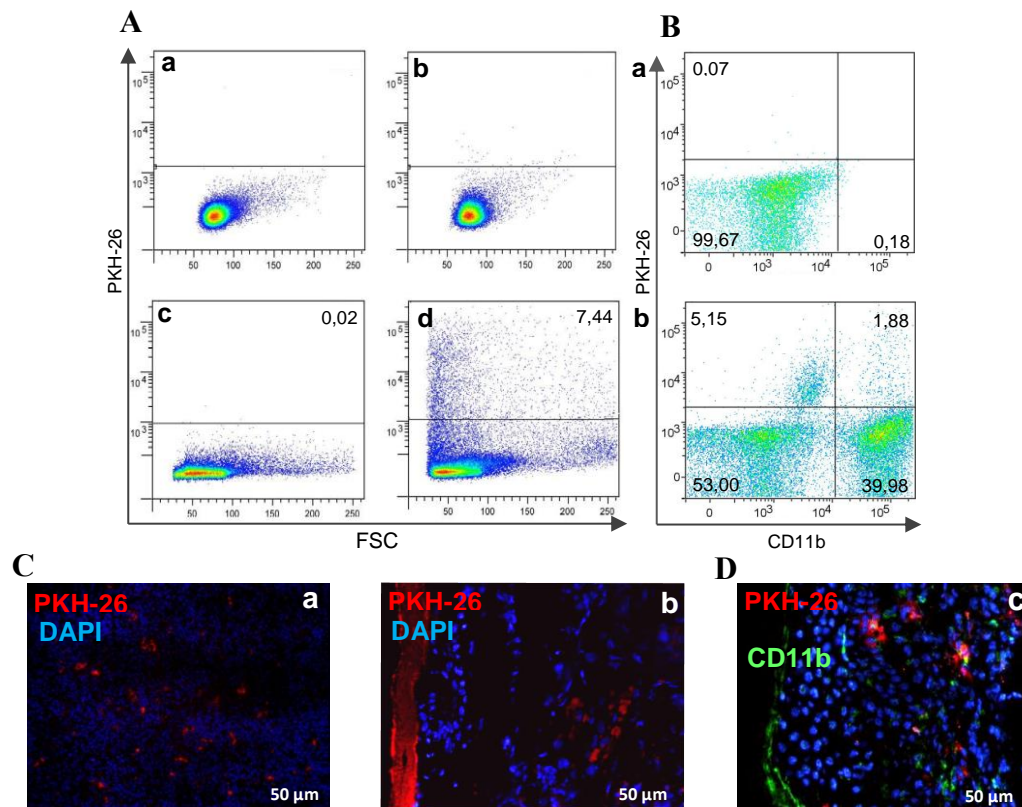
MSC získané z kostní dřeně byly kultivovány po dobu 3 týdnů a purifikovány pro odstranění kontaminujících buněk. Další kultivace byla prováděna v přítomnosti extraktu

z rohovek a IGF-I. Následná analýza prokázala, že přítomnost rohovkového extraktu indukovala v MSC expresi specifických znaků rohovkových buněk jako je cytokeratin 12 (K12), keratokan a lumikan. Přítomnost IGF-I tuto diferenciaci významně zvýšila. Morfologie diferencovaných buněk byla srovnatelná s kontrolními nediferencovanými MSC a exprese povrchových znaků (CD44, CD73, CD105) byla stejná u diferencovaných i kontrolních buněk. Navíc diferencované MSC vykazovaly vyšší proliferační aktivitu. Studium funkčních vlastností ukázalo, že kontrolní i diferencované buňky inhibují produkci cytokinů v kultuře slezinných buněk stimulovaných Konkanavalinem A. MSC kultivované v přítomnosti extraktu z rohovek a IGF-I tak sice exprimují znaky rohovkových buněk, ale zachovávají si vlastnosti MSC.

A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype (Hajkova et al. 2015)

Působení MSC jsme testovali i v modelu alogenní transplantace kůže. Vzhledem k tomu, že rejekční reakce po transplantaci kůže je velmi silná, použili jsme nanovláknový materiál obsahující imunosupresivní látku CsA. Nanovláknó sloužilo zároveň jako nosič MSC. Tento model výhodně kombinuje výhody lokální aplikace MSC podávaných spolu s imunosupresivní látkou. Prokázali jsme, že lokálně podávané MSC migrují do transplantované kůže i do spádových lymfatických uzlin. V daném modelu jsme dále charakterizovali lokální i systémovou imunitní odpověď. V transplantované kůži u myší, kterým byly zároveň aplikovány MSC a CsA jsme detekovali signifikantně snížené množství makrofágů a zároveň produkci NO. Tento pokles koreloval s potlačenou produkcí IFN- γ ve štěpech i spádových lymfatických uzlinách. Naopak procento alternativně aktivovaných makrofágů (definovaných znaky F4/80 a CD206) a produkce IL-10 infiltrujícími makrofágy byly signifikantně zvýšeny. Schopnost MSC aktivovat změnu fenotypu makrofágů z populace M1 do protizánětlivé populace M2 jsme potvrdili *in vitro*. Naše výsledky ukazují, že lokální aplikace MSC navozuje přesmyk populace makrofágů na alternativně aktivované, produkující vysoké hladiny IL-10 a přítomnost CsA tento přesmyk významně zvyšuje. Přítomnost imunosupresivních látek při podávání MSC tak vykazuje pozitivní efekty pro potlačení zánětlivé imunitní reakce. Vzhledem k tomu, že

v řadě klinických studií se předpokládá aplikace MSC se současným podáváním imunosupresivní terapie má toto zjištění značný význam pro klinickou praxi.



Distribuce MSC značených PKH-26 u příjemců trasplantátu kůže 6 dní po transplantaci
A, B FACS analýza přítomnosti MSC v lymfatických uzlinách (Aa,b) a kožních štěpech (Ac,c;B) u kontrolních příjemců (Aa,c) a příjemců, kterým byly podávány MSC (Ab,d;Bb); Ba neznačené buňky.
C Kryořezy spádové lymfatické uzliny (Ca) a kožního štěpu (Cb;D) ukazující distribuci MSC
Obrázky B,D dokumentují, že MSC nejsou ve tkáních příjemce pohlceny makrofágy.

Další projekty zahrnují studium mechanismů, kterými MSC působí na buňky imunitního systému. Sledovali jsme vliv MSC na polarizaci T buněčných populací i na aktivované B lymfocyty. Ve zmíněných pracích jsme se zaměřili především na možnost navození regulačního fenotypu u T i B buněk. Působení regulačních buněk patří mezi nejvýznamnější imunosupresivní mechanismy, proto má přesné poznání působení MSC na jejich vznik a funkci značný význam v oblasti výzkumu MSC. Rovněž objasnění mechanismu interakce MSC s imunosupresivními látkami a vliv kombinovaného působení na buňky imunitního systému je nezbytné pro další rozšíření aplikace MSC.

The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population (Svobodova et al., 2012)

Vzhledem k našim předchozím výsledkům i na základě široce publikovaných dat o imunosupresivních vlastnostech MSC jsme studovali vliv MSC na vývoj a polarizaci protizánětlivé populace Treg a pro-zánětlivé populace Th17 lymfocytů. Ustavení rovnováhy těchto populací je totiž rozhodující pro normální fungování organismu, nerovnováha naopak může vést k rozvoji autoimunitních a dalších onemocnění. Prokázaným faktem je, že MSC produkují oba cytokiny (TGF- β a IL-6) nezbytné k polarizaci těchto dvou populací a to především v závislosti na mikroprostředí, ve kterém se nacházejí.

Pomocí *in vitro* modelu jsme prokázali, že MSC efektivně regulují expresi transkripčních faktorů Foxp3 a ROR γ t a kontrolují vývoj Treg a Th17 lymfocytů u aktivovaných myších slezinných buněk, i purifikovaných CD4⁺CD25⁻ T lymfocytů. Dále jsme ukázali, že imunomodulační efekt MSC byl silnější po stimulaci pomocí TGF- β , nebo TGF- β v kombinaci s IL-6. Nestimulované MSC produkují vysoké hladiny TGF- β a neprodukují IL-6. Produkce TGF- β je dále zvýšena v přítomnosti protizánětlivého prostředí IL-10, nebo TGF- β . Naopak v pro-zánětlivém prostředí je kromě TGF- β indukována také produkce IL-6. U naivních populací Th lymfocytů dochází v přítomnosti TGF- β k přesmyku na Treg exprimující transkripční faktor Foxp3, naopak přítomnost TGF- β společně s IL-6 vede k vývoji ROR γ t pozitivních Th17 buněk. MSC recipročně

regulují vývoj těchto dvou významných populací lymfocytů a mohou tak modulovat autoimunitní, imunopatologické a transplantační reakce.

Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN-gamma-treated mesenchymal stem cells (Hermankova et al., 2016)

Studovali jsme také mechanismus působení MSC na B lymfocyty, především na populaci regulačních B lymfocytů (Breg). Tyto buňky jsou charakterizovány vysokou produkcí IL-10.

Popsané mechanismy působení MSC na B lymfocyty dosud zahrnovaly především nepřímý vliv přes ovlivnění T lymfocyty. Naše výsledky ukazují, že přímý kontakt MSC a B lymfocytů navozuje změny v Cox-2 dependentní dráze a ovlivňuje tak vlastnosti B lymfocytů.

Mesenchymal stem cells attenuate the adverse effects of immunosuppressive drugs on distinct T cell subpopulations (Hajkova et al. 2016)

Lze očekávat, že pro prodloužení přežití budou alogenní MSC podávány společně s imunosupresivními látkami. V řadě studií již bylo prokázáno, že MSC ovlivňují působení imunosupresiv a naopak. Zajímavé jsou práce, které ukazují prodloužení přežití transplantovaných tkání, pokud byla imunosupresivní terapie kombinována s podáváním MSC. Nicméně přesné mechanismy této interakce popsány nebyly. V naší práci jsme sledovali vliv pěti imunosupresivních látek (inhibitor kalcineurinu – CsA, inhibitor inosin monofosfát dehydrogenázy – MMF, inhibitor mTOR - mammalian target of rapamycin – Rapa a glukokortikoidy prednison a dexamethason) s různým mechanismem účinku na jednotlivé populace T lymfocytů a porovnali jsme účinnost jednotlivých imunosupresiv podávaných v kombinaci s MSC. Testovali jsme vliv MSC na přežívání a aktivaci CD4⁺ a CD8⁺ lymfocytů po podání imunosupresivních látek, změny v procentuální populaci T buněk Th17 (ROR γ t⁺), Th1 (T-bet⁺), Th2 (GATA-3⁺) a Treg (Foxp3⁺) a produkci korespondujících cytokinů (IL-17, IFN γ , IL-4 and IL-10). Prokázali jsme, že MSC modulují

funkci imunosupresivních látek, podávání MSC v kombinaci s imunosupresivy ovlivňuje přežívání, aktivaci T buněk a také poměr mezi jednotlivými T-buněčnými populacemi. Významné bylo potlačení zánětlivé Th17 populace a podpora funkce protizánětlivých Treg.

Tyto výsledky ukazují, že terapie pomocí MSC může být účinným nástrojem pro potlačení negativních efektů imunosupresivních látek na imunitní systém.

Seznam literatury

- Aggarwal, S., and M.F. Pittenger. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 105:1815-1822.
- Augello, A., R. Tasso, S.M. Negrini, A. Amateis, F. Indiveri, R. Cancedda, and G. Pennesi. 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*. 35:1482-1490.
- Augello, A., R. Tasso, S.M. Negrini, R. Cancedda, and G. Pennesi. 2007. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 56:1175-1186.
- Baron, F., C. Lechanteur, E. Willems, F. Bruck, E. Baudoux, L. Seidel, J.F. Vanbellinhen, K. Hafraoui, M. Lejeune, A. Gothot, G. Fillet, and Y. Beguin. 2010. Cotransplantation of Mesenchymal Stem Cells Might Prevent Death from Graft-versus-Host Disease (GVHD) without Abrogating Graft-versus-Tumor Effects after HLA-Mismatched Allogeneic Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 16:838-847.
- Bartholomew, A., C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, A. Moseley, and R. Hoffman. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*. 30:42-48.
- Bazhanov, N., J.H. Ylostalo, T.J. Bartosh, A. Tiblow, A. Mohammadipoor, A. Foskett, and D.J. Prockop. 2016. Intraperitoneally infused human mesenchymal stem cells form aggregates with mouse immune cells and attach to peritoneal organs. *Stem Cell Research & Therapy*. 7.
- Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons. 2008. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2:313-319.
- Brandau, S., M. Jakob, H. Hemedda, K. Bruderek, S. Janeschik, F. Bootz, and S. Lang. 2010. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *Journal of Leukocyte Biology*. 88:1005-1015.
- Breitbach, M., T. Bostani, W. Roell, Y. Xia, O. Dewald, J.M. Nygren, J.W.U. Fries, K. Tiemann, H. Bohlen, J. Hescheler, A. Welz, W. Bloch, S.E.W. Jacobsen, and B.K. Fleischmann. 2007. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 110:1362-1369.
- Brown, J.M., K. Nemeth, N.M. Kushnir-Sukhov, D.D. Metcalfe, and E. Mezey. 2011. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clinical and Experimental Allergy*. 41:526-534.
- Bunnell, B.A., A.M. Betancourt, and D.E. Sullivan. 2010. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 1.
- Caplan, A.I. 1991. Mesenchymal stem-cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9:641-650.
- Caplan, A.I., and J.M. Sorrell. 2015. The MSC curtain that stops the immune system. *Immunology Letters*. 168:136-139.
- Carrillo-Galvez, A.B., M. Cobo, S. Cuevas-Ocana, A. Gutierrez-Guerrero, A. Sanchez-Gilabert, P. Bongarzone, A. Garcia-Perez, P. Munoz, K. Benabdellah, M.G. Toscano, F. Martin, and P. Anderson. 2015. Mesenchymal Stromal Cells Express GARP/LRRC32 on Their Surface: Effects on Their Biology and Immunomodulatory Capacity. *Stem Cells*. 33:183-195.
- Casiraghi, F., N. Azzollini, P. Cassis, B. Imberti, M. Morigi, D. Cugini, R.A. Cavinato, M. Todeschini, S. Solini, A. Sonzogni, N. Perico, G. Remuzzi, and M. Noris. 2008. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *Journal of Immunology*. 181:3933-3946.

- Cassatella, M.A., F. Mosna, A. Micheletti, V. Lisi, N. Tamassia, C. Cont, F. Calzetti, M. Pelletier, G. Pizzolo, and M. Krampera. 2011. Toll-Like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils. *Stem Cells*. 29:1001-1011.
- Cejka, C., J. Cejkova, P. Trosan, A. Zajicova, E. Sykova, and V. Holan. 2016. Transfer of mesenchymal stem cells and cyclosporine A on alkali-injured rabbit cornea using nanofiber scaffolds strongly reduces corneal neovascularization and scar formation. *Histology and Histopathology*. 31:969-980.
- Chabannes, D., M. Hill, E. Merieau, J. Rossignol, R. Brion, J.P. Soulillou, I. Anegon, and M.C. Cuturi. 2007. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*. 110:3691-3694.
- Chen, L., E.E. Tredget, C. Liu, and Y. Wu. 2009. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS One*. 4:e7119.
- Cho, H.H., Y.C. Bae, and J.S. Jung. 2006. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*. 24:2744-2752.
- Corcione, A., F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G.L. Mancardi, V. Pistoia, and A. Uccelli. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 107:367-372.
- Coulson-Thomas, V.J., B. Caterson, and W.W.Y. Kao. 2013. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells cures the corneal defects of mucopolysaccharidosis VII mice. *Stem Cells*. 31:2116-2126.
- Crop, M.J., S.S. Korevaar, R. de Kuiper, J.N.M. Ijzermans, N.M. van Besouw, C.C. Baan, W. Weimar, and M.J. Hoogduijn. 2011. Human Mesenchymal Stem Cells Are Susceptible to Lysis by CD8(+) T Cells and NK Cells. *Cell Transplantation*. 20:1547-1559.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanese, P.D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, and A.M. Gianni. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 99:3838-3843.
- Djouad, F., L.M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Pence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, C. Jorgensen, and D. Noel. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 25:2025-2032.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315-317.
- Dua, H.S., and A. Azuara-Blanco. 2000. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*. 44:415-425.
- Duran, N.E., and D.W. Hommes. 2016. Stem cell-based therapies in inflammatory bowel disease: promises and pitfalls. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 9:533-547.
- Eggenhofer, E., V. Benseler, A. Kroemer, F.C. Popp, E.K. Geissler, H.J. Schlitt, C.C. Baan, M.H. Dahlke, and M.J. Hoogduijn. 2012. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Frontiers in Immunology*. 3.
- Eggenhofer, E., F. Luk, M.H. Dahlke, and M.J. Hoogduijn. 2014. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*. 5.
- Eggenhofer, E., P. Renner, Y. Soeder, F.C. Popp, M.J. Hoogduijn, E.K. Geissler, H.J. Schlitt, and M.H. Dahlke. 2011. Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transplantation Immunology*. 25:141-147.
- English, K., A. French, and K.J. Wood. 2010. Mesenchymal Stromal Cells: Facilitators of Successful Transplantation? *Cell Stem Cell*. 7:431-442.

- Francois, M., R. Romieu-Mourez, S. Stock-Martineau, M.N. Boivin, J.L. Bramson, and J. Galipeau. 2009. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*. 114:2632-2638.
- Friis, T., M. Haack-Sorensen, A.B. Mathiasen, R.S. Ripa, U.S. Kristoffersen, E. Jorgensen, L. Hansen, L. Bindslev, A. Kjaer, B. Hesse, E. Dickmeiss, and J. Kastrup. 2011. Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. 45:161-168.
- Fu, X.B., B. Han, S. Cai, Y.H. Lei, T.Z. Sun, and Z.Y. Sheng. 2009. Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor-alpha and its possible role in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 17:185-191.
- Fuentes-Julian, S., F. Arnalich-Montiel, L. Jaumandreu, M. Leal, A. Casado, I. Garcia-Tunon, E. Hernandez-Jimenez, E. Lopez-Collazo, and M.P. De Miguel. 2015. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Administration Does Not Improve Corneal Graft Survival Outcome. *PLoS One*. 10:25.
- Gazdic, M., V. Volarevic, N. Arsenijevic, and M. Stojkovic. 2015. Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases. *Stem Cell Reviews and Reports*. 11:280-287.
- Ge, W., J. Jiang, M.L. Baroja, J. Arp, R. Zassoko, W. Liu, A. Bartholomew, B. Garcia, and H. Wang. 2009. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *American Journal of Transplantation*. 9:1760-1772.
- Glennie, S., I. Soeiro, P.J. Dyson, E.W.F. Lam, and F. Dazzi. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 105:2821-2827.
- Gonzalez-Rey, E., P. Anderson, M.A. Gonzalez, L. Rico, D. Buscher, and M. Delgado. 2009. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 58:929-939.
- Gotherstrom, C., A. West, J. Liden, M. Uzunel, R. Lahesmaa, and K. Le Blanc. 2005. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica-the Hematology Journal*. 90:1017-1026.
- Gotherstrom, C., M. Westgren, S.W.S. Shaw, E. Astrom, A. Biswas, P.H. Byers, C.N.Z. Mattar, G.E. Graham, J. Taslimi, U. Ewald, N.M. Fisk, A.E.J. Yeoh, J.L. Lin, P.J. Cheng, M. Choolani, K. Le Blanc, and J.K.Y. Chan. 2014. Pre- and Postnatal Transplantation of Fetal Mesenchymal Stem Cells in Osteogenesis Imperfecta: A Two-Center Experience. *Stem Cells Translational Medicine*. 3:255-264.
- Griffin, T.P., W.P. Martin, N. Islam, T. O'Brien, and M.D. Griffin. 2016. The Promise of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Diabetic Kidney Disease. *Current Diabetes Reports*. 16.
- Gu, L.H., T.T. Zhang, Y. Li, H.J. Yan, H. Qi, and F.R. Li. 2015. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells transplanted via different routes in diabetic rats. *Cellular & Molecular Immunology*. 12:444-455.
- Hajkova M , Javorkova E, Zajicova A, Trosan P, Holan V, Krulova M. A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015
- Hanson, S.E., K.R. Kleinbeck, D. Cantu, J. Kim, M.L. Bentz, L.D. Faucher, W.J. Kao, and P. Hematti. 2016. Local delivery of allogeneic bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a porcine model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 10:E90-E100.
- Hare, J.M., J.E. Fishman, G. Gerstenblith, D.L.D. Velazquez, J.P. Zambrano, V.Y. Suncion, M. Tracy, E. Ghersin, P.V. Johnston, J.A. Brinker, E. Breton, J. Davis-Sproul, I.H. Schulman, J. Byrnes, A.M. Mendizabal, M.H. Lowery, D. Rouy, P. Altman, C.W.P. Foo, P. Ruiz, A. Amador, J. Da Silva, I.K. McNiece, and A.W. Heldman. 2012. Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by

- Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy The POSEIDON Randomized Trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 308:2369-2379.
- Hermankova, B., A. Zajicova, E. Javorkova, M. Chudickova, P. Trosan, M. Hajkova, M. Krulova, and V. Holan. 2016. Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN-gamma-treated mesenchymal stem cells. *Immunobiology*. 221:129-136.
- Holan, V., M. Chudickova, P. Trosan, E. Svobodova, M. Krulova, S. Kubinova, E. Sykova, J. Sirc, J. Michalek, M. Juklickova, M. Munzarova, and A. Zajicova. 2011. Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *Journal of Controlled Release*. 156:406-412.
- Honzarenko, M., Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A.M. Glodek, and L.E. Silberstein. 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 24:1030-1041.
- Hoogduijn, M.J. 2015. Are mesenchymal stromal cells immune cells? *Arthritis Research & Therapy*. 17:7.
- Hoogduijn, M.J., M. Roemeling-van Rhijn, A.U. Engela, S.S. Korevaar, F.K.F. Mensah, M. Franquesa, R.W.F. de Bruin, M.G.H. Betjes, W. Weimar, and C.C. Baan. 2013. Mesenchymal Stem Cells Induce an Inflammatory Response After Intravenous Infusion. *Stem Cells and Development*. 22:2825-2835.
- Horwitz, E.M., P.L. Gordon, W.K.K. Koo, J.C. Marx, M.D. Neel, R.Y. McNall, L. Muul, and T. Hofmann. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:8932-8937.
- Huang, S., L.L. Xu, Y.X. Sun, Y.F. Zhang, and G. Li. 2015. The fate of systemically administrated allogeneic mesenchymal stem cells in mouse femoral fracture healing. *Stem Cell Research & Therapy*. 6.
- Huber-Lang, M., R. Wiegner, L. Lampl, and R.E. Brenner. 2016. Mesenchymal Stem Cells after Polytrauma: Actor and Target. *Stem Cells International*:10.
- Ip, J.E., Y.J. Wu, J. Huang, L.N. Zhang, R.E. Pratt, and V.J. Dzau. 2007. Mesenchymal stem cells use integrin beta 1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Molecular Biology of the Cell*. 18:2873-2882.
- Javorkova, E., P. Trosan, A. Zajicova, M. Krulova, M. Hajkova, and V. Holan. 2014. Modulation of the Early Inflammatory Microenvironment in the Alkali-Burned Eye by Systemically Administered Interferon-gamma-Treated Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells and Development*. 23:2490-2500.
- Jeong, J.O., J.W. Han, J.M. Kim, H.J. Cho, C. Park, N. Lee, D.W. Kim, and Y.S. Yoon. 2011. Malignant Tumor Formation After Transplantation of Short-Term Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Experimental Myocardial Infarction and Diabetic Neuropathy. *Circulation Research*. 108:1340-U1107.
- Jia, Z., C.N. Jiao, S.Z. Zhao, X.R. Li, X.J. Ren, L. Zhang, Z.C. Han, and X.M. Zhang. 2012. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model. *Experimental Eye Research*. 102:44-49.
- Kastrup, J., T. Friis, M. Haack-Soerensen, R.S. Ripa, U.S. Kristoffersen, A.B. Mathiasen, B. Hesse, A. Kjaer, E. Dickmeiss, and E. Joergensen. 2009. Autologous mesenchymal stromal cell-derived endothelial progenitors therapy to improve vascularization and symptoms in patients with chronic coronary artery disease. *European Heart Journal*. 30:451-452.
- Katritsis, D.G., P.A. Sotiropoulou, E. Karvouni, I. Karabinos, S. Korovesis, S.A. Perez, E.M. Vouridis, and M. Papamichail. 2005. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 65:321-329.

- Kim, J., and P. Hematti. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*. 37:1445-1453.
- Kim, J.S., S.H. Cha, W.S. Kim, S.J. Han, S.B. Cha, H.M. Kim, K.W. Kwon, S.J. Kim, H.H. Choi, J. Lee, S.N. Cho, W.J. Koh, Y.M. Park, and S.J. Shin. 2016. A Novel Therapeutic Approach Using Mesenchymal Stem Cells to Protect Against Mycobacterium abscessus. *Stem Cells*. 34:1957-1970.
- Kim, J.W., J.H. Lee, Y.S. Lyoo, D.I. Jung, and H.M. Park. 2013. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary Dermatology*. 24:242-E253.
- Kober, J., A. Gugerell, M. Schmid, M. Zeyda, E. Buchberger, S. Nickl, S. Hacker, H.J. Ankersmit, and M. Keck. 2016. Wound Healing Effect of Conditioned Media Obtained From Adipose Tissue on Human Skin Cells A Comparative in Vitro Study. *Annals of Plastic Surgery*. 77:156-163.
- Koc, O.N., S.L. Gerson, B.W. Cooper, S.M. Dyhouse, S.E. Haynesworth, A.I. Caplan, and H.M. Lazarus. 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 18:307-316.
- Komoda, H., H. Okura, C.M. Lee, N. Sougawa, T. Iwayama, T. Hashikawa, A. Saga, A. Yamamoto-Kakuta, A. Ichinose, S. Murakami, Y. Sawa, and A. Matsuyama. 2010. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid Xenoantigen on Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells/Mesenchymal Stem Cells Leads to Safer and More Useful Cell Sources for Various Stem Cell Therapies. *Tissue Engineering Part A*. 16:1143-1155.
- Krampera, M. 2011. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia*. 25:1408-1414.
- Krasnodembskaya, A., Y.L. Song, X.H. Fang, N. Gupta, V. Serikov, J.W. Lee, and M.A. Matthay. 2010. Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37. *Stem Cells*. 28:2229-2238.
- Kristjansson, B., and S. Honsawek. 2014. Current Perspectives in Mesenchymal Stem Cell Therapies for Osteoarthritis. *Stem Cells International*:13.
- Krulova, M., K. Pokorna, A. Lencova, J. Fric, A. Zajicova, M. Filipec, J.V. Forrester, and V. Holan. 2008. A rapid separation of two distinct populations of mouse corneal epithelial cells with limbal stem cell characteristics by centrifugation on Percoll gradient. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49:3903-3908.
- Kurtzberg, J., S. Prockop, P. Teira, H. Bittencourt, V. Lewis, K.W. Chan, B. Horn, L. Yu, J.A. Talano, E. Nemecek, C.R. Mills, and S. Chaudhury. 2014. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Therapy (Remestemcel-L, Prochymal) as a Rescue Agent for Severe Refractory Acute Graft-versus-Host Disease in Pediatric Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 20:229-235.
- Kuzmina, L.A., N.A. Petinati, E.N. Parovichnikova, L.S. Lubimova, E.O. Gribanova, T.V. Gaponova, I.N. Shipounova, O.A. Zhironkina, A.E. Bigildeev, D.A. Svinareva, N.J. Drize, and V.G. Savchenko. 2012. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells International*.
- Lalande, C., S. Miraux, S.M. Derkaoui, S. Mornet, R. Bareille, J.C. Fricain, J.M. Franconi, C. Le Visage, D. Letourneur, J. Amedee, and A.K. Bouzier-Sore. 2011. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *European Cells & Materials*. 21:341-354.
- Lan, Y.N., S. Kodati, H.S. Lee, M. Omoto, Y.P. Jin, and S.K. Chauhan. 2012. Kinetics and Function of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 53:3638-3644.
- Lazarus, H.M. 1995. Bone-marrow transplantation in low-grade non-hodgkin's-lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 17:199-210.

- Lazarus, H.M., O.N. Koc, S.M. Devine, P. Curtin, R.T. Maziarz, H.K. Holland, E.J. Shpall, P. McCarthy, K. Atkinson, B.W. Cooper, S.L. Gerson, M.J. Laughlin, F.R. Loberiza, A.B. Moseley, and A. Bacigalupo. 2005. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 11:389-398.
- Le Blanc, K., F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M.E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R.M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, O. Ringdén, and Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 371:1579-1586.
- Le Blanc, K., C. Gotherstrom, O. Ringden, M. Hassan, R. McMahon, E. Horwitz, G. Anneren, O. Axelsson, J. Nunn, U. Ewald, S. Norden-Lindeberg, M. Jansson, A. Dalton, E. Astrom, and M. Westgren. 2005. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 79:1607-1614.
- Le Blanc, K., and D. Mougiakakos. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*. 12:383-U317.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringden. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 363:1439-1441.
- Lepelletier, Y., S. Lecourt, A. Renand, B. Arnulf, V. Vanneaux, J.P. Femand, P. Menasche, T. Domet, J.P. Marolleau, O. Hermine, and J. Larghero. 2010. Galectin-1 and Semaphorin-3A Are Two Soluble Factors Conferring T-Cell Immunosuppression to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell. *Stem Cells and Development*. 19:1075-1079.
- Li, F., and S.Z. Zhao. 2016. Control of Cross Talk between Angiogenesis and Inflammation by Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Ocular Surface Diseases. *Stem Cells International*.
- Li, M.R., Y.L. Zhao, H.J. Hao, W.D. Han, and X.B. Fu. 2015. Mesenchymal stem cell-based therapy for nonhealing wounds: today and tomorrow. *Wound Repair and Regeneration*. 23:465-482.
- Liu, H.S., J.H. Zhang, C.Y. Liu, I.J. Wang, M. Sieber, J. Chang, J.V. Jester, and W.W.Y. Kao. 2010. Cell Therapy of Congenital Corneal Diseases with Umbilical Mesenchymal Stem Cells: Lumican Null Mice. *PLoS One*. 5.
- Liu, J., X.F. Lu, L. Wan, Y.P. Li, S.F. Li, L.Y. Zeng, Y.Z. Zeng, L.H. Cheng, Y.R. Lu, and J.Q. Cheng. 2004. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig Inbred-line. *Transplantation Proceedings*. 36:3272-3275.
- Llufriu, S., M. Sepulveda, Y. Blanco, P. Marin, B. Moreno, J. Berenguer, I. Gabilondo, E. Martinez-Heras, N. Sola-Valls, J.A. Arnaiz, E.J. Andreu, B. Fernandez, S. Bullich, B. Sanchez-Dalmau, F. Graus, P. Villoslada, and A. Saiz. 2014. Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 9:15.
- Lombardo, E., O. DelaRosa, P. Mancheno-Corvo, R. Menta, C. Ramirez, and D. Buscher. 2009. Toll-like Receptor-Mediated Signaling in Human Adipose-Derived Stem Cells: Implications for Immunogenicity and Immunosuppressive Potential. *Tissue Engineering Part A*. 15:1579-1589.
- Ma, H.C., X.L. Shi, H.Z. Ren, X.W. Yuan, and Y.T. Ding. 2014. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 to acute failing liver improves liver regeneration. *World Journal of Gastroenterology*. 20:14884-14894.
- Maggini, J., G. Mirkin, I. Bognanni, J. Holmberg, I.M. Piazzón, I. Nepomnaschy, H. Costa, C. Cañones, S. Raiden, M. Vermeulen, and J.R. Geffner. 2010. Mouse bone marrow-

- derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 5:e9252.
- Majumdar, M.K., M. Keane-Moore, D. Buyaner, W.B. Hardy, M.A. Moorman, K.R. McIntosh, and J.D. Mosca. 2003. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science*. 10:228-241.
- Maria, A.T.J., K. Toupet, M. Maumus, G. Fonteneau, A. Le Quellec, C. Jorgensen, P. Guilpain, and D. Noel. 2016. Human adipose mesenchymal stem cells as potent anti-fibrosis therapy for systemic sclerosis. *Journal of Autoimmunity*. 70:31-39.
- Mei, S.H.J., J.J. Haitsma, C.C. Dos Santos, Y.P. Deng, P.F.H. Lai, A.S. Slutsky, W.C. Liles, and D.J. Stewart. 2010. Mesenchymal Stem Cells Reduce Inflammation while Enhancing Bacterial Clearance and Improving Survival in Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 182:1047-1057.
- Meisel, R., S. Brockers, K. Heseler, O. Degistirici, H. Bulle, C. Woite, S. Stuhlsatz, W. Schwippert, M. Jager, R. Sorg, R. Henschler, J. Seissler, D. Dilloo, and W. Daubener. 2011. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*. 25:648-654.
- Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener, and D. Dilloo. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 103:4619-4621.
- Mele, L., P.P. Vitiello, V. Tirino, F. Paino, A. De Rosa, D. Liccardo, G. Papaccio, and V. Desiderio. 2016. Changing Paradigms in Cranio-Facial Regeneration: Current and New Strategies for the Activation of Endogenous Stem Cells. *Frontiers in Physiology*. 7:13.
- Melief, S.M., E. Schrama, M.H. Brugman, M.M. Tiemessen, M.J. Hoogduijn, W.E. Fibbe, and H. Roelofs. 2013. Multipotent Stromal Cells Induce Human Regulatory T Cells Through a Novel Pathway Involving Skewing of Monocytes Toward Anti-inflammatory Macrophages. *Stem Cells*. 31:1980-1991.
- Monguio-Tortajada, M., R. Lauzurica-Valdemoros, and F.E. Borrás. 2015. Tolerance in organ transplantation: from conventional immunosuppression to extracellular vesicles. *Frontiers in Immunology*. 5:12.
- Mosser, D.M., and X. Zhang. 2008. Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 14:Unit 14.12.
- Munir, H., and H.M. McGettrick. 2015. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease: Risks and Rewards. *Stem Cells and Development*. 24:2091-2100.
- Najar, M., G. Raicevic, H.I. Boufker, B. Stamatopoulos, C. De Bruyn, N. Meuleman, D. Bron, M. Toungouz, and L. Lagneaux. 2010. Modulated expression of adhesion molecules and galectin-1: Role during mesenchymal stromal cell immunoregulatory functions. *Experimental Hematology*. 38:922-932.
- Najar, M., G. Raicevic, E. Crompot, H. Fayyad-Kazan, D. Bron, M. Toungouz, and L. Lagneaux. 2016. The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network. *Journal of Immunotherapy*. 39:45-59.
- Nasef, A., Y.Z. Zhang, C. Mazurier, S. Bouchet, M. Bensidhoum, S. Francois, N.C. Gorin, M. Lopez, D. Thierry, L. Fouillard, and A. Chapel. 2009. Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *International Journal of Laboratory Hematology*. 31:9-19.
- Nauta, A.J., A.B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze, and W.E. Fibbe. 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34(+)-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology*. 177:2080-2087.
- Nguyen, T.M., A. Arthur, J.D. Hayball, and S. Gronthos. 2013. EphB and Ephrin-B Interactions Mediate Human Mesenchymal Stem Cell Suppression of Activated T-Cells. *Stem Cells and Development*. 22:2751-2764.

- Nieder Korn, J.Y. 2010. High-risk corneal allografts and why they lose their immune privilege. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 10:493-497.
- Oh, J.Y., M.K. Kim, M.S. Shin, H.J. Lee, J.H. Ko, W.R. Wee, and J.H. Lee. 2008. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*. 26:1047-1055.
- Oh, J.Y., R.H. Lee, J.M. Yu, J.H. Ko, H.J. Lee, A.Y. Ko, G.W. Roddy, and D.J. Prockop. 2012. Intravenous Mesenchymal Stem Cells Prevented Rejection of Allogeneic Corneal Transplants by Aborting the Early Inflammatory Response. *Molecular Therapy*. 20:2143-2152.
- Orozco, L., A. Munar, R. Soler, M. Alberca, F. Soler, M. Huguet, J. Sentis, A. Sanchez, and J. Garcia-Sancho. 2013. Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: A Pilot Study. *Transplantation*. 95:1535-1541.
- Owen, A., and P.N. Newsome. 2015. Mesenchymal stromal cell therapy in liver disease: opportunities and lessons to be learnt? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 309:G791-G800.
- Paul, C., A.F. Samdani, R.R. Betz, I. Fischer, and B. Neuhuber. 2009. Grafting of Human Bone Marrow Stromal Cells Into Spinal Cord Injury A Comparison of Delivery Methods. *Spine*. 34:328-334.
- Pellegrini, G., P. Rama, F. Mavilio, and M. De Luca. 2009. Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy. *Journal of Pathology*. 217:217-228.
- Peng, Y.W., X.Y. Chen, Q.F. Liu, D.J. Xu, H.Q. Zheng, L.S. Liu, Q.L. Liu, M.Y. Liu, Z.P. Fan, J. Sun, X.B. Li, R.F. Zou, and A.P. Xiang. 2014. Alteration of Naive and Memory B-Cell Subset in Chronic Graft-Versus-Host Disease Patients After Treatment With Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 3:1023-1031.
- Peng, Y.W., M. Ke, L. Xu, L.S. Liu, X.Y. Chen, W.J. Xia, X.B. Li, Z. Chen, J.J. Ma, D.H. Liao, G.H. Li, J.L. Fang, G.H. Pan, and A.P. Xiang. 2013. Donor-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined With Low-Dose Tacrolimus Prevent Acute Rejection After Renal Transplantation: A Clinical Pilot Study. *Transplantation*. 95:161-168.
- Perico, N., F. Casiraghi, M. Inrona, E. Gotti, M. Todeschini, R.A. Cavinato, C. Capelli, A. Rambaldi, P. Cassis, P. Rizzo, M. Cortinovich, M. Marasa, J. Golay, M. Noris, and G. Remuzzi. 2011. Autologous Mesenchymal Stromal Cells and Kidney Transplantation: A Pilot Study of Safety and Clinical Feasibility. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 6:412-422.
- Petrou, P., Y. Gothelf, Z. Argov, M. Gotkine, Y.S. Levy, I. Kassis, A. Vaknin-Dembinsky, T. Ben-Hur, D. Offen, O. Abramsky, E. Melamed, and D. Karussis. 2016. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *Jama Neurology*. 73:337-344.
- Pevsner-Fischer, M., V. Morad, M. Cohen-Sfady, L. Rousso-Noori, A. Zanin-Zhorov, S. Cohen, I.R. Cohen, and D. Zipori. 2007. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*. 109:1422-1432.
- Pietila, M., S. Lehtonen, E. Tuovinen, K. Lahteenmaki, S. Laitinen, H.V. Leskela, A. Natynki, J. Pesala, K. Nordstrom, and P. Lehenkari. 2012. CD200 Positive Human Mesenchymal Stem Cells Suppress TNF-Alpha Secretion from CD200 Receptor Positive Macrophage-Like Cells. *PLoS One*. 7.
- Popp, F.C., E. Eggenhofer, P. Renner, P. Slowik, S.A. Lang, H. Kaspar, E.K. Geissler, P. Piso, H.J. Schlitt, and M.H. Dahlke. 2008. Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transpl Immunol*. 20:55-60.
- Prockop, D.J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276:71-74.

- Quaedackers, M.E., C.C. Baan, W. Weimar, and M.J. Hoogduijn. 2009. Cell contact interaction between adipose-derived stromal cells and allo-activated T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 39:3436-3446.
- Rafei, M., E. Birman, K. Forner, and J. Galipeau. 2009. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Molecular Therapy*. 17:1799-1803.
- Raicevic, G., R. Rouas, M. Najar, P. Stordeur, H.I. Boufker, D. Bron, P. Martiat, M. Goldman, M.T. Nevegninsky, and L. Lagneaux. 2010. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Human Immunology*. 71:235-244.
- Rasulov, M.F., V.T. Vasilenko, V.A. Zaidenov, and N.A. Onishchenko. 2006. Cell transplantation inhibits inflammatory reaction and stimulates repair processes in burn wound. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 142:112-115.
- Reinders, M.E.J., J.W. de Fijter, H. Roelofs, I.M. Bajema, D.K. de Vries, A.F. Schaapherder, F.H.J. Claas, P. van Miert, D.L. Roelen, C. van Kooten, W.E. Fibbe, and T.J. Rabelink. 2013. Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Allograft Rejection After Renal Transplantation: Results of a Phase I Study. *Stem Cells Translational Medicine*. 2:107-111.
- Reinshagen, H., C. Auw-Haedrich, R.V. Sorg, D. Boehringer, P. Eberwein, J. Schwartzkopff, R. Sundmacher, and T. Reinhard. 2011. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmologica*. 89:741-748.
- Ren, G.W., A.I. Roberts, and Y.F. Shi. 2011. Adhesion molecules Key players in Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adhesion & Migration*. 5:20-28.
- Roddy, G.W., J.Y. Oh, R.H. Lee, T.J. Bartosh, J. Ylostalo, K. Coble, R.H. Rosa, and D.J. Prockop. 2011. Action at a Distance: Systemically Administered Adult Stem/Progenitor Cells (MSCs) Reduce Inflammatory Damage to the Cornea Without Engraftment and Primarily by Secretion of TNF-alpha Stimulated Gene/Protein 6. *Stem Cells*. 29:1572-1579.
- Rombouts, W.J.C., and R.E. Ploemacher. 2003. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. 17:160-170.
- Romieu-Mourez, R., M. Francois, M.N. Boivin, J. Stagg, and J. Galipeau. 2007. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *Journal of Immunology*. 179:1549-1558.
- Sasaki, M., R. Abe, Y. Fujita, S. Ando, D. Inokuma, and H. Shimizu. 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology*. 180:2581-2587.
- Sato, K., K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, K. Muroi, and K. Ozawa. 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 109:228-234.
- Savukinas, U.B., S.R. Enes, A.A. Sjolund, and G. Westergren-Thorsson. 2016. Concise Review: The Bystander Effect: Mesenchymal Stem Cell-Mediated Lung Repair. *Stem Cells*. 34:1437-1444.
- Schraufstatter, I.U., R.G. DiScipio, M. Zhao, and S.K. Khaldoyanidi. 2009. C3a and C5a Are Chemotactic Factors for Human Mesenchymal Stem Cells, Which Cause Prolonged ERK1/2 Phosphorylation. *Journal of Immunology*. 182:3827-3836.
- Schweizer, R., V.S. Gorantla, and J.A. Plock. 2015. Promise and promise of mesenchymal stem cell-based therapies in clinical vascularized composite allotransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 20:608-614.
- Selmani, Z., A. Naji, I. Zidi, B. Favier, E. Gaiffe, L. Obert, C. Borg, P. Saas, P. Tiberghien, N. Rouas-Freiss, E.D. Carosella, and F. Deschaseaux. 2008. Human leukocyte antigen-G5

- secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4(+)CD25(high)FOXP3(+) regulatory T cells. *Stem Cells*. 26:212-222.
- Shi, M., J. Li, L. Liao, B. Chen, B. Li, L. Chen, H. Jia, and R.C. Zhao. 2007. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: Role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica-the Hematology Journal*. 92:897-904.
- Silverwood, V., M. Blagojevic-Bucknall, C. Jinks, J.L. Jordan, J. Protheroe, and K.P. Jordan. 2015. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 23:507-515.
- Singh, A., and D. Sen. 2016. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). *Stem Cell Research & Therapy*. 7.
- Sioud, M., A. Mobergslien, A. Boudabous, and Y. Floisand. 2010. Evidence for the Involvement of Galectin-3 in Mesenchymal Stem Cell Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 71:267-274.
- Sioud, M., A. Mobergslien, A. Boudabous, and Y. Floisand. 2011. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *International Journal of Oncology*. 38:385-390.
- Song, X.L., S.S. Xie, K. Lu, and C.H. Wang. 2015. Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Asthma by Inducing Polarization of Alveolar Macrophages. *Inflammation*. 38:485-492.
- Spaggiari, G.M., A. Capobianco, S. Becchetti, M.C. Mingari, and L. Moretta. 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 107:1484-1490.
- Squillaro, T., G. Peluso, and U. Galderisi. 2016. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplantation*. 25:829-848.
- Stoff, A., A.A. Rivera, N.S. Banerjee, S.T. Moore, T.M. Numnum, A. Espinosa-De-Los-Monteros, D.F. Richter, G.P. Siegal, L.T. Chow, D. Feldman, L.O. Vasconez, J.M. Mathis, M.A. Stoff-Khalili, and D.T. Curiel. 2009. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. *Experimental Dermatology*. 18:362-369.
- Suva, D., J. Passweg, S. Arnaudeau, P. Hoffmeyer, and V. Kindler. 2008. In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal stromal cells and transmigrate under them. *Journal of Cellular Physiology*. 214:588-594.
- Svobodova, E., M. Krulova, A. Zajicova, K. Pokorna, J. Prochazkova, P. Trosan, and V. Holan. 2012. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem Cells and Development*. 21:901-910.
- Sykova, E., P. Jendelova, L. Urdzikova, P. Lesny, and A. Hejcl. 2006. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels-two strategies for spinal cord injury repair. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 26:1113-1129.
- Tan, J.M., W.Z. Wu, X.M. Xu, L.M. Liao, F. Zheng, S. Messinger, X.H. Sun, J. Chen, S.L. Yang, J.Q. Cai, X. Gao, A. Pileggi, and C. Ricordi. 2012. Induction Therapy With Autologous Mesenchymal Stem Cells in Living-Related Kidney Transplants A Randomized Controlled Trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 307:1169-1177.
- Tomchuck, S.L., K.J. Zwezdaryk, S.B. Coffelt, R.S. Waterman, E.S. Danka, and A.B. Scandurro. 2008. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*. 26:99-107.
- Trosan, P., E. Javorkova, A. Zajicova, M. Hajkova, B. Hermankova, J. Kossel, M. Krulova, and V. Holan. 2016. The Supportive Role of Insulin-Like Growth Factor-I in the Differentiation of Murine Mesenchymal Stem Cells into Corneal-Like Cells. *Stem Cells and Development*. 25:874-881.

- Trosan, P., E. Svobodova, M. Chudickova, M. Krulova, A. Zajicova, and V. Holan. 2012. The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process. *Stem Cells and Development*. 21:3341-3350.
- Tyndall, A., and J.M. van Laar. 2016. Stem cell transplantation and mesenchymal cells to treat autoimmune diseases. *Presse Medicale*. 45:E159-E169.
- Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 8:726-736.
- Vitova, A., M. Filipec, A. Zajicova, M. Krulova, and V. Holan. 2004. Prevention of corneal allograft rejection in a mouse model of high risk recipients. *British Journal of Ophthalmology*. 88:1338-1342.
- Waterman, R.S., S.L. Tomchuck, S.L. Henkle, and A.M. Betancourt. 2010. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS One*. 5.
- Wei, L., J.L. Fraser, Z.Y. Lu, X.Y. Hu, and S.P. Yu. 2012. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiology of Disease*. 46:635-645.
- Wynn, R.F., C.A. Hart, C. Corradi-Perini, L. O'Neill, C.A. Evans, J.E. Wraith, L.J. Fairbairn, and I. Bellantuono. 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 104:2643-2645.
- Yang, S.H., M.J. Park, I.H. Yoon, S.Y. Kim, S.H. Hong, J.Y. Shin, H.Y. Nam, Y.H. Kim, B. Kim, and C.G. Park. 2009. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Experimental and Molecular Medicine*. 41:315-324.
- Yang, Y., M.F. Song, Y. Liu, H. Liu, L. Sun, Y.M. Peng, F.Y. Liu, M.A. Venkatachalam, and Z. Dong. 2016. Renoprotective approaches and strategies in acute kidney injury. *Pharmacology & Therapeutics*. 163:58-73.
- Yao, L., Z.R. Li, W.R. Su, Y.P. Li, M.L. Lin, W.X. Zhang, Y. Liu, Q. Wan, and D. Liang. 2012. Role of Mesenchymal Stem Cells on Cornea Wound Healing Induced by Acute Alkali Burn. *PLoS One*. 7.
- Zajicova, A., K. Pokorna, A. Lencova, M. Krulova, E. Svobodova, S. Kubinova, E. Sykova, M. Pradny, J. Michalek, J. Svobodova, M. Munzarova, and V. Holan. 2010. Treatment of Ocular Surface Injuries by Limbal and Mesenchymal Stem Cells Growing on Nanofiber Scaffolds. *Cell Transplantation*. 19:1281-1290.
- Zangi, L., R. Margalit, S. Reich-Zeliger, E. Bachar-Lustig, A. Beilhack, R. Negrin, and Y. Reisner. 2009. Direct Imaging of Immune Rejection and Memory Induction by Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells*. 27:2865-2874.
- Zappia, E., S. Casazza, E. Pedemonte, F. Benvenuto, I. Bonanni, E. Gerdoni, D. Giunti, A. Ceravolo, F. Cazzanti, F. Frassoni, G. Mancardi, and A. Uccelli. 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 106:1755-1761.
- Zhang, D.S., G.C. Fan, X.Y. Zhou, T.M. Zhao, Z.S. Pasha, M.F. Xu, Y. Zhu, M. Ashraf, and Y.G. Wang. 2008. Over-expression of CXCR4 on mesenchymal stem cells augments myoangiogenesis in the infarcted myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 44:281-292.
- Zhang, L.Y., V.J. Coulson-Thomas, T.G. Ferreira, and W.W.Y. Kao. 2015. Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. *Bmc Ophthalmology*. 15.
- Zhuang, Y., X. Chen, M. Xu, L.Y. Zhang, and F. Xiang. 2009. Chemokine stromal cell-derived factor 1/CXCL12 increases homing of mesenchymal stem cells to injured myocardium and neovascularization following myocardial infarction. *Chinese Medical Journal*. 122:183-187.

Přílohy