

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie (navazující magisterské studium)

Studijní obor: Imunologie



Bc. Kristýna Černá

Vliv endogenních faktorů na mezenchymální kmenové buňky

Effect of endogenous factors on mesenchymal stem cells

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

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

V Praze, 7. 8. 2020

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D za cenné rady a vstřícnost nejen při psaní diplomové práce, ale i v průběhu studia. Zároveň chci poděkovat i všem členům Laboratoře imunoregulací (katedra buněčné biologie, PřF UK, Praha) za rady a přátelské pracovní prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Udržení homeostáze je nezbytné pro přežití organismu. Stres homeostázu narušuje a připravuje tělo na psychickou či fyzickou zátěž. Při stresu se uvolňují stresové endogenní faktory, které působí na regeneraci tkání, imunitní systém a různé metabolické pochody. Chronický stres tělo vyčerpává a má negativní vliv na zmíněné procesy. Opačný vliv má akutní stres. Mezenchymální kmenové buňky se podílejí na regeneračních procesech a modulují buňky imunitního systému. Lze předpokládat, že stres bude mít vliv i na MSCs. Tato práce měla za cíl sledovat vliv vybraných stresových faktorů, noradrenalinu a kortikosteronu na vlastnosti a funkce MSCs v akutním a chronickém modelu stresu. Stresové faktory neměly vliv na morfologii, vitalitu a diferenciační schopnosti MSCs. Avšak v přítomnosti obou stresových faktorů byla snížena metabolická aktivita MSCs bez ohledu na délku jejich působení. Působení stresových faktorů také ovlivnilo produkci některých imunologicky relevantních molekul a proteinů. Výsledky bohužel neukazují jednoznačný vliv stresových faktorů na modulaci lymfocytů prostřednictvím MSCs.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, katecholaminy, adrenergní receptory, glukokortikoidy

Abstract

Maintaining of homeostasis is essential for the survival of the organism. Stress disturbs the homeostasis and prepares the organism for mental or physical stress. During the stress situation, the endogenous stress factors are released. Through these factors stress affects tissue regeneration, the immune system and other metabolic processes. Chronic stress impacts many parts of body and mind and has a negative effect on these processes. Acute stress has the opposite effect. Mesenchymal stem cells (MSCs) participate in regenerative processes and modulate the immune system. Therefore, it can be assumed that stress will affect on MSCs. The aim of this study was to investigate the effect of stress factors, norepinephrine and corticosterone on the properties and function of MSCs in acute and chronic stress model. In our study, stress factors did not affect the morphology, vitality and differentiation of MSCs. However, the metabolic activity of MSCs was reduced regardless of the duration of their action. The action of stress factors also affected the production of some immunologically relevant molecules and proteins. Unfortunately, the results did not show a clear effect of stress factors on the lymphocyte modulation by MSCs.

Key words: mesenchymal stem cells, catecholamines, adrenergic receptors, glucocorticoids

Obsah

1. Seznam použitých zkratek	8
2. Úvod	11
3. Literární přehled	12
3.1 Mezenchymální kmenové buňky	12
3.1.1 Regenerativní schopnosti MSCs	13
3.1.2 Imunomodulační vlastnosti MSCs	14
3.1.2.1 Vliv MSCs na buňky nespecifické imunity	14
3.1.2.2 Vliv MSCs na buňky specifické imunity	15
3.2 Stres	17
3.2.1 Vliv stresu na imunitní systém	18
3.3 Stresové endogenní faktory	20
3.3.1 Glukokortikoidy	20
3.3.1.1 Glukokortikoidy a imunitní systém	20
3.3.2 Katecholaminy	21
3.3.2.1 Katecholaminy a imunitní systém	22
3.4 Vliv stresových endogenních faktorů na MSCs	23
3.4.1 Vliv katecholaminů na MSCs	23
3.4.2 Vliv glukokortikoidů na MSCs	26
4. Cíl práce	29
5. Metody a materiál	30
5.1 Zvířata	30
5.2 Média a roztoky	30
5.3 Technické vybavení	31
5.4 Software	31
5.5 In vitro model	32
5.6 Izolace a kultivace MSCs	33
5.7 Izolace splenocytů	34
5.8 Kultivace MSCs se splenocyty	34
5.9 Průtoková cytometrie	34
5.10 Měření NO	37
5.11 ELISA test	37
5.12 PCR	39
5.13 WST test	40

5.14	Mikroskopie MSCs	41
5.15	Diferenciace MSCs	41
5.16	Statistická analýza	42
6.	Výsledky	43
6.1	Morfologie MSCs	43
6.2	Fenotyp MSCs	44
6.3	Diferenciace MSCs	46
6.4	Přežívání MSCs	47
6.5	Metabolická aktivita MSCs	47
6.6	Vliv zánětlivých faktorů na MSCs.....	48
6.6.1	Produkce NO	48
6.6.2	Produkce IL-6	49
6.6.3	PCR.....	51
6.7	Vliv MSCs na lymfocyty	52
6.7.1	Apoptóza lymfocytů	52
6.7.2	Vliv na zastoupení populací lymfocytů	53
6.7.3	Aktivace lymfocytů	55
6.7.4	Proliferace lymfocytů	57
6.7.5	Populace Treg buněk	59
6.7.6	Populace Th17 buněk	60
6.7.7	ELISA test	61
7.	Diskuse	62
8.	Závěr.....	68
9.	Zdroje	69

1. Seznam použitých zkratek

A700	Alexa Fluor 700
AC	adenylatecyclase, adenylátcykláza
ACTH	adrenocorticotropic hormone, adrenokortikotropní hormon
AD	adrenaline, adrenalin
APC	allophycocyanine, alofykocyanin
AR	adrenergic receptor, adrenergní receptor
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
CO	corticosterone, kortikosteron
ConA	concanavalin A, konkanavalin A
COX2	cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2
CRH	corticotropin-releasing hormone, hormon uvolňující kortikotropin
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole, 4,6-diamidino-2-fenylindol
DC	dendritic cells, dendritické buňky
DEX	dexamethasone, dexametazon
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay, test imunoenzymatické reakce
EVs	extracellular vesicles, extracelulární váčky
FasL	Fas ligand
FCS	fetal calf serum, fetální telecí sérum
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothyokyanát
GCs	glucocorticoids, glukokortikoidy
GR	glucocorticoid receptor, glukokortikoidní receptor

HDAC6	histone deacetylase 6, histon deacetyláza 6
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA	human leucocyte antigen, lidský leukocytární antigen
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hypotalamicko-hypofyzární-nadledvinová osa
HPS	heat shock protein, protein tepelného šoku
ICAM-1	intracellular adhesive molecule 1, intracelulární adhezivní molekula 1
IDO	indolamine-2,3-dioxygenase, indolamin-2,3-dioxygenáza
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin, imunoglobulin
IL	interleukin
KGF	keratinocyte growth factor, růstový faktor keratinocytů
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
mAb	monoclonal antibodies, monoklonální protilátka
MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MR	mineralocorticoid receptor, mineralokortikoidní receptor
MSCs	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
MVs	microvesicles, mikrovezikuly
NE	norepinephrine, noradrenalin
NO	nitric oxide, oxid dusnatý
PBS	phosphate buffer solution, fosfátový pufr
PD-L1/2	programmed death ligand 1/2, ligand programované buněčné smrti 1/2
PE	phycoerythrin, fykoerytrin
PGE2	prostaglandin E2, prostaglandin E2

PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase, fosfatidylinositol-3-kináza
PLC	phospholipasa C, fosfolipáza C
RPMI	Roswell Memorial Park Institute 1640 medium
SCF	stem cells factor, faktor kmenových buněk
SDF-1	stromal cell-derived factor 1, faktor stromální buněk 1
Tc	cytotoxic T-lymphocyte, cytotoxické T-lymfocyty
TGF β	transforming growth factor β , transformující růstový faktor β
Th	helper T-lymphocytes, pomocné T-lymfocyty
TLR	toll-like receptor
TNF α	tumor necrosis factor α , faktor nádorové nekrózy α
Treg	regulatory T-lymphocytes, regulační T-lymfocyty
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1, vaskulární adhezivní molekula 1
VEGF	endothelial vascular growth factor, endoteliální růstový faktor

2. Úvod

První zmínka o mezenchymálních kmenových buňkách (MSCs, mesenchymal stem cells) pochází ze 60. let minulého století. Od té doby se pohled na vlastnosti a schopnosti MSCs prohloubil. Studie se v posledních letech zabývají jejich schopnostmi a klinickém využití především jako možné podpory léčby při transplantacích či v autoimunitních onemocněních.

Pacienti potýkající se s hojením ran po operaci či léčbou autoimunitních onemocnění jsou často vystaveni stresovým podmínkám. Při stresu se zvyšují hladiny stresových faktorů jako jsou katecholaminy a glukokortikoidy. Při akutním stresu hladiny těchto faktorů organismus nabudí a připraví na zátěž. Avšak při chronickém stresu jsou hladiny těchto faktorů stále zvýšené, organismus se vyčerpává a zpomaluje se proces hojení. MSCs hrají v procesu hojení důležitou roli, především díky schopnosti modulovat buňky imunitního systému, diferenciaci v různé buněčné typy a následného nahrazení poškozených buněk. Reakcí MSCs na stresové faktory se pravděpodobně změní jejich vlastnosti a schopnosti. Proto se v posledních letech studie zaměřují na vliv stresu a jeho faktorů na vlastnosti a funkce MSCs, a to především na schopnost diferenciaci a regenerace. Poznáním vlivu stresových faktorů na MSCs může přinést odpovědi ohledně pomalého hojení během chronického stresu a přinést nové terapeutické možnosti.

3. Literární přehled

3.1 Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) byly objeveny Alexandrem Friedensteinem, který je izoloval z kostní dřeně (Friedenstein, Piatetzky and Petrakova, 1966). Buňky se podobaly fibroblastům a od té doby byly izolovány téměř za všech tkání, a to jak z fetálních, tak i z dospělých - placenta, tuková tkáň, lymfatické uzliny, kůže, zubní tkáň, vlasový folikul atd (Madrigal, Rao and Riordan, 2014). MSCs jsou multipotentní buňky se schopností sebeobnovy a za určitých podmínek jsou schopny se diferenciovat do všech tří zárodečných linií – ektodermu, mezodermu a endodermu (Ullah, Subbarao and Rho, 2015).

MSCs je velmi heterogenní populace buněk bez specifického znaku. Proto jsou definované na základě tří minimálních kritérií, která byla stanovena Mezinárodní společností pro buněčnou terapii. Zaprvé, buňky jsou za standardních kultivačních podmínek adherentní k plastu. Zadruhé, *in vitro* jsou schopny se diferenciovat v adipocyty, chondrocyty a osteocyty. Tato schopnost je typicky prokazována specifickým barvením diferenciovaných buněk – Oil Red O pro adipocyty, Alizarin Red pro osteocyty a Alcian Blue pro chondrocyty. Zatřetí, MSCs exprimují na svém povrchu specifické diferenciační skupiny (CD, cluster of differentiation) – CD105, CD73, CD44 a CD90. Zároveň nesmí exprimovat znaky hematopoetických buněk – CD45, CD31, CD34, CD11b a lidský leukocytární antigen (HLA, human leucocyte antigen) II. třídy (Dominici *et al.*, 2006).

MSCs se nacházejí strategicky v perivaskulárních prostorech téměř po celém těle. Jsou schopny migrovat do poraněných tkání a místa poškození, kde se podílejí na regeneraci tkání a potlačení zánětu. Přesný mechanismus migrace není zatím zcela objasněný. Avšak při dlouhodobé kultivaci a zvyšujícímu se počtu pasáží MSCs se snižuje modulační potenciál či regenerace, a zvyšuje se pravděpodobnost maligní transformace buněk (Ullah, Subbarao and Rho, 2015).

3.1.1 Regenerativní schopnosti MSCs

MSCs jsou schopny se podílet na regeneraci tkání. Jak již bylo zmíněno, MSCs se dokážou diferenciovat ve specifické buňky všech tří zárodečných linií a tím nahradit poškozené buňky a tkáně. Dále sekretují cévní endoteliální růstový faktor (VEGF, endothelial vascular growth factor), angiopoietin-1, růstový faktor hepatocytů (HGF, hepatocyte growth factor) a další molekuly potřebné pro angiogenezi (Spees, Lee and Gregory, 2016). Bylo popsáno, že po aplikování MSCs inhibovaly apoptózu neuronů, a naopak podpořily proliferaci buněk po mrtvici, především prostřednictvím produkovaného VEGF (Deng *et al.*, 2010). Tento faktor se také významně podílel na regeneraci srdeční tkáně po infarktu myokardu (Tang *et al.*, 2005) a proliferaci myoblastových buněk při regeneraci kosterní svaloviny (Sassoli *et al.*, 2012).

MSCs mohou vytvořit nanotubuly široké 50-200 nm, skrz které jsou schopné předávat poškozené buňce nukleové kyseliny, ionty, mitochondrie či jiné organely (Spees, Lee and Gregory, 2016). Liu *et al.* prokázali, že přenos mitochondrií z MSCs do epiteliálních buněk pomocí nanotubulů inhibuje apoptózu těchto buněk (Liu *et al.*, 2014).

MSCs mohou také uvolňovat extracelulární váčky (EVs, extracellular vesicles), které zprostředkovávají přenos látek a komunikaci mezi buňkami. EVs se dělí na dva typy – exosomy velké 40-100 nm a mikrovezikuly (MVs, microvesicles) velké 50-1000 nm. EVs obvykle obsahují miRNA, cytokiny, růstové faktory, antimikrobiální peptidy a další faktory, které napomáhají protizánětlivé odpovědi a regeneraci tkání (Merino-González *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2017). Monsel *et al.* ukázali, že MVs izolované z MSCs potlačily nemožnost růst bakterií a zvýšily přežívání myši, které byli infikované patogenní *Escherichia coli*. Snížení bakteriálního růstu bylo srovnatelné se skupinou léčenou přímo MSCs. V bronchoalveolární tekutině myši léčených MVs či MSCs byly detekované zvýšené hladiny prostaglandinu E2 (PGE2, prostaglandin E2), růstového faktoru keratinocytů (KGF, keratinocyte growth factor), interleukinu (IL, interleukin) 10 a počet makrofágů, naopak hladina faktoru nádorové nekrózy α (TNF α , tumor necrosis factor) byla snížena (Monsel *et al.*, 2015).

3.1.2 Imunomodulační vlastnosti MSCs

MSCs se podílejí na modulaci vlastností imunitních buněk, mohou působit protekčně proti odhojování transplantátu, septickému šoku či v regulaci zánětlivé reakce. Důležitou roli hraje sekrece solubilních faktorů a exprese povrchových znaků. Mezi solubilní faktory patří například HGF, transformující růstový faktor β (TGF β , transforming growth factor), IL-1, IL-6, IL-10, faktor kmenových buněk (SCF, stem cells factor), oxid dusnatý (NO, nitric oxide), indolamin-2,3-dioxygenáza (IDO, indolamine-2,3-dioxygenase), PGE2 a mnoho dalších. Mezi povrchové znaky modulující buňky imunitního systému patří ligand programované buněčné smrti 1/2 (PD-L1/2, programmed death ligand 1/2) a Fas ligand (FasL, Fas ligand) (obr. 1) (Wang, Yuan and Xie, 2018).

MSCs se mohou polarizovat ve dva fenotypy – MSC1 a MSC2. Fenotyp MSC1 se tvoří, pokud je v mikroprostředí přítomno málo prozánětlivých cytokinů a zánět se teprve rozvíjí. Zároveň je důležitá přítomnost velkého počtu bakterií, které stimulují MSCs prostřednictvím vazby lipopolysacharidu (LPS, lipopolysaccharide) na toll-like receptor (TLR, toll-like receptor) 4. Naopak k polarizaci na fenotyp MSC2 dochází, pokud jsou přítomné zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů či je buňka stimulována prostřednictvím vazby na TLR-3 (Gazdic *et al.*, 2015).

MSCs mají za normálních podmínek nízkou expresi hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, major histocompatibility complex) I., chybí jim exprese MHC II. a kostimulačních molekul. To z nich dělá hypoimunogenní buňky, které jsou chráněny před lýzou NK buňkami a Tc buňkami, proto se MSCs mohou použít i od alogenního dárce (Ullah, Subbarao and Rho, 2015). MSCs izolované z různých tkání se odlišují svými imunomodulačními vlastnostmi. Například MSCs z tukové tkáně vykazují větší imunosupresivní účinek na NK buňky a CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty než MSCs získané z kostní dřeně (Ribeiro *et al.*, 2013).

3.1.2.1 Vliv MSCs na buňky nespecifické imunity

Makrofágy hrají důležitou roli v nespecifické imunitě. Mohou existovat ve dvou fenotypech – M1 fenotyp definovaný produkcí prozánětlivých cytokinů a NO, a M2 protizánětlivý fenotyp definovaný produkcí IL-10. MSCs potlačují M1 fenotyp, a naopak iniciují polarizaci v M2 protizánětlivý fenotyp (Hajkova *et al.*, 2017). Tuto iniciaci MSCs navozují především produkcí PGE2, který snižuje expresi TNF α a IL-6 (Nemeth *et al.*, 2009). Dále PGE2

indukuje u makrofágů povrchový znak CD206, který je typický pro M2 fenotyp (Kim and Hematti, 2009).

Dalšími buňkami nespecifické imunity jsou neutrofilů, jejichž hlavní funkcí je fagocytóza a respirační vzplanutí. MSCs sekretují IL-6, prostřednictvím kterého inhibují respirační vzplanutí a oddalují apoptózu neutrofilů (Raffaghello *et al.*, 2008).

NK (natural killer) buňky jsou hlavní efektorové buňky nespecifické imunity. MSCs regulují proliferaci NK buněk. Zároveň jsou schopny zvýšit produkci interferonu (INF, interferon) γ a TNF α aktivovanými NK buňkami. Dále po společné kultivaci zvyšují degranulaci, sekreci granzymů a perforinu (Spaggiari *et al.*, 2008; Najar *et al.*, 2018).

Žírné buňky, které obsahují granule s histaminem, se podílejí na zánětlivých procesech a alergických reakcích. MSCs snižují schopnost migrace a infiltrace žírných buněk. Také potlačují prostřednictvím PGE2 inhibují schopnost degranulace (Brown *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015).

Dendritické buňky (DC, dendritic cells) jsou antigen prezentující buňky, které tvoří spojení mezi nespecifickou a specifickou imunitou. MSCs jsou schopny potlačit prostřednictvím PGE2 produkci TNF α či migraci DC (Aggarwal and Pittenger, 2005). Dále indukují regulační fenotyp DC, pro který je charakteristická snížená exprese CD1a, CD80, CD86, CD40. Tyto DC pak dále indukovaly vznik Treg lymfocytů (Zhao *et al.*, 2012).

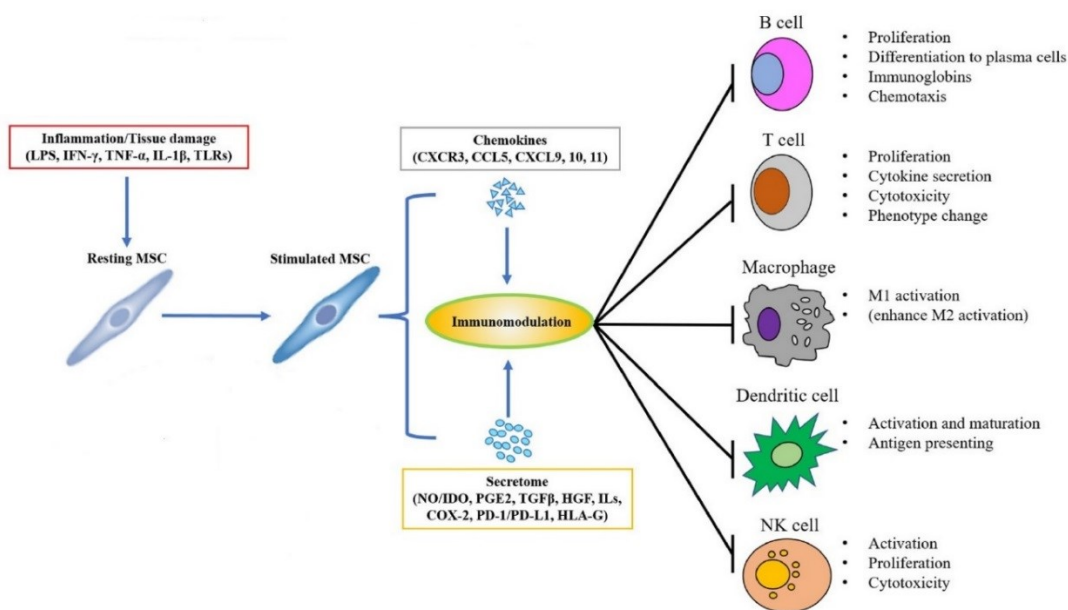
3.1.2.2 Vliv MSCs na buňky specifické imunity

T lymfocyty jsou buňky specifické imunity, které jsou rozděleny do několika základních populací – efektorové pomocné T-lymfocyty (Th, helper T-lymphocyte) 1, Th2, Th17, regulační T-lymfocyty (Treg, regulatory T-lymphocyte) a cytotoxické T-lymfocyty (Tc, cytotoxic T-lymphocyte).

MSCs inhibují buněčný cyklus T-lymfocytů mezi G₀ a G₁ buněčnými fázemi (Glennie *et al.*, 2005). Mezi solubilní faktory, kterými ovlivňují T-lymfocyty patří,IDO, NO, IL-6, PGE2, HGF a TGF β (Wang, Yuan and Xie, 2018). Snižují produkci INF γ Th1 lymfocyty a IL-17 Th17 lymfocyty. Naopak MSCs zvyšují produkci IL-4 a IL-10 Th2 lymfocyty a IL-10 Treg lymfocyty (Aggarwal and Pittenger, 2005). Pomocí IL-6 a TGF β jsou MSCs schopny regulovat polarizaci v Th17 lymfocyty či Treg lymfocyty (Mohammadzadeh *et al.*, 2014; Svobodova *et al.*, 2012). Prostřednictvím IDO, PGE2 a

TGF β inhibují MSCs vývoj a správnou funkci Tc lymfocytů (Rasmusson *et al.*, 2003; Ullah, Subbarao and Rho, 2015). T-lymfocyty jsou inhibovány i buněčným kontaktem prostřednictvím povrchových molekul PD-L1/2 a FasL (Augello *et al.*, 2005).

Součástí specifické imunity jsou také B-lymfocyty jejichž funkcí je produkce protilátek, cytokinů a prezentace antigenů. Stejně jako u T-lymfocytů inhibují MSCs buněčný cyklus B-lymfocytů mezi G₀ a G₁ buněčnými fázemi - např. prostřednictvím PD-L1/2 (Augello *et al.*, 2005). B-lymfocyty v přítomnosti MSCs snižují produkci imunoglobulinu (Ig, immunoglobulin) A, IgM a IgG. Dále MSCs snižují expresi chemokinových receptorů CXCR4, CXCR5 a CCR7 a chemotaxi k CXCL12 a CXCL13 (Corcione *et al.*, 2006). Jiné studie ukazují odlišné výsledky modulace B-lymfocytů, což může být dáno také poměrem použitých MSCs a B-lymfocytů či odlišným původem buněk (Franquesa *et al.*, 2012).



Obrázek 1. Imunomodulační vlastnosti MSCs. MSCs se v místě poranění či zánětu stimulují a atrahují ostatní imunitní buňky pomocí produkováných chemokinů. MSCs sekretují další faktory, kterými moduluji proliferaci, polarizaci a další funkce imunitních buněk. (převzato a upraveno z Yuan, Logan and Ma, 2019)

3.2 Stres

Stres je z fyziologického hlediska definovaný jako narušení homeostáze v organismu na základě stresového stimulu (stresoru). Stresory mohou pocházet z vnějšího i vnitřního prostředí a dále mohou být fyziologického či psychologického původu. Patří mezi ně např. přehnaná fyzická zátěž, poranění, nemoci, deprese či alkoholismus a další (Smith and Vale, 2006).

Také je možné definovat stres jako proces, kdy je organismus vystavený nepřiměřené zátěži a snaží se uvést znovu do homeostáze. V tomto procesu hraje hlavní roli interakce těla a mozku. Na odpovědi na stres se podílí dva druhy řízení. Prvním je nervové řízení, do kterého patří několik oblastí mozku (prefrontální kortex, hipokampus, amygdala, *nucleus accumbens*) a vegetativní nervy (sympatikus a parasympatikus). Druhé je hormonální řízení, které zahrnuje endokrinní žlázy a stresové endogenní faktory jako jsou adrenalin, noradrenalin, kortizol a kortikosteron. Když je organismus vystaven stresoru, spouští se nervové řízení. Mozkový signalizační systém vyhodnotí situaci, po které se uvolní neurotransmitery a aktivují se vegetativní nervy sympatiku. Následuje aktivace hypotalamicko-hypofyzární-nadledvinové osy (HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal axis) v paraventikulárním jádru hypotalamu. Po aktivaci HPA následuje uvolňování vasopresinu a hormonu uvolňujícího kortikotropin (CRH, corticotropin-releasing hormone) z neurosekrečních buněk. CRH se váže na své specifické receptory v přední hypofýze a stimuluje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH, adrenocorticotropic hormone), který je uvolňován do celkového oběhu. ACTH se poté váže na své specifické receptory v dřeni nadledvin a stimuluje produkci adrenalinu/noradrenalinu. Dále ACTH působí v kůře nadledvin a stimuluje produkci glukokortikoidů (GCs, glucocorticoids) (obr. 2) (Smith and Vale, 2006; Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005).

Glukokortikoidy mají mnoho metabolických účinků, které mají ve výsledku obnovit homeostázu organismu. Jsou schopny aktivovat enzymy, které se podílejí na glukoneogenezi, aktivují katecholaminy a způsobují hyperglykemii, která je důležitá jako prvek přežití stresové situace (Marik and Bellomo, 2013; Smith and Vale, 2006). V neposlední řadě glukokortikoidy působí na HPA a produkci ACTH negativní zpětnou vazbou. Pokud je v organismu vysoká hladina glukokortikoidů, tak dojde k inhibici HPA a naopak. Tato vazba zajišťuje návrat do homeostáze (Smith and Vale, 2006). Ovšem při

chronickém stresu, který trvá týdny i měsíce, organismus nestíhá produkovat potřebnou energii. Zvyšuje se pravděpodobnost vzniku rakoviny, dochází k poruchám kognitivních funkcí, gastrointestinálním onemocněním, či rozvoji autoimunitních onemocnění a celkově dochází k vyčerpání organismu (Yaribeygi *et al.*, 2017; Sandi *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2000; Reiche, Nunes and Morimoto, 2004).

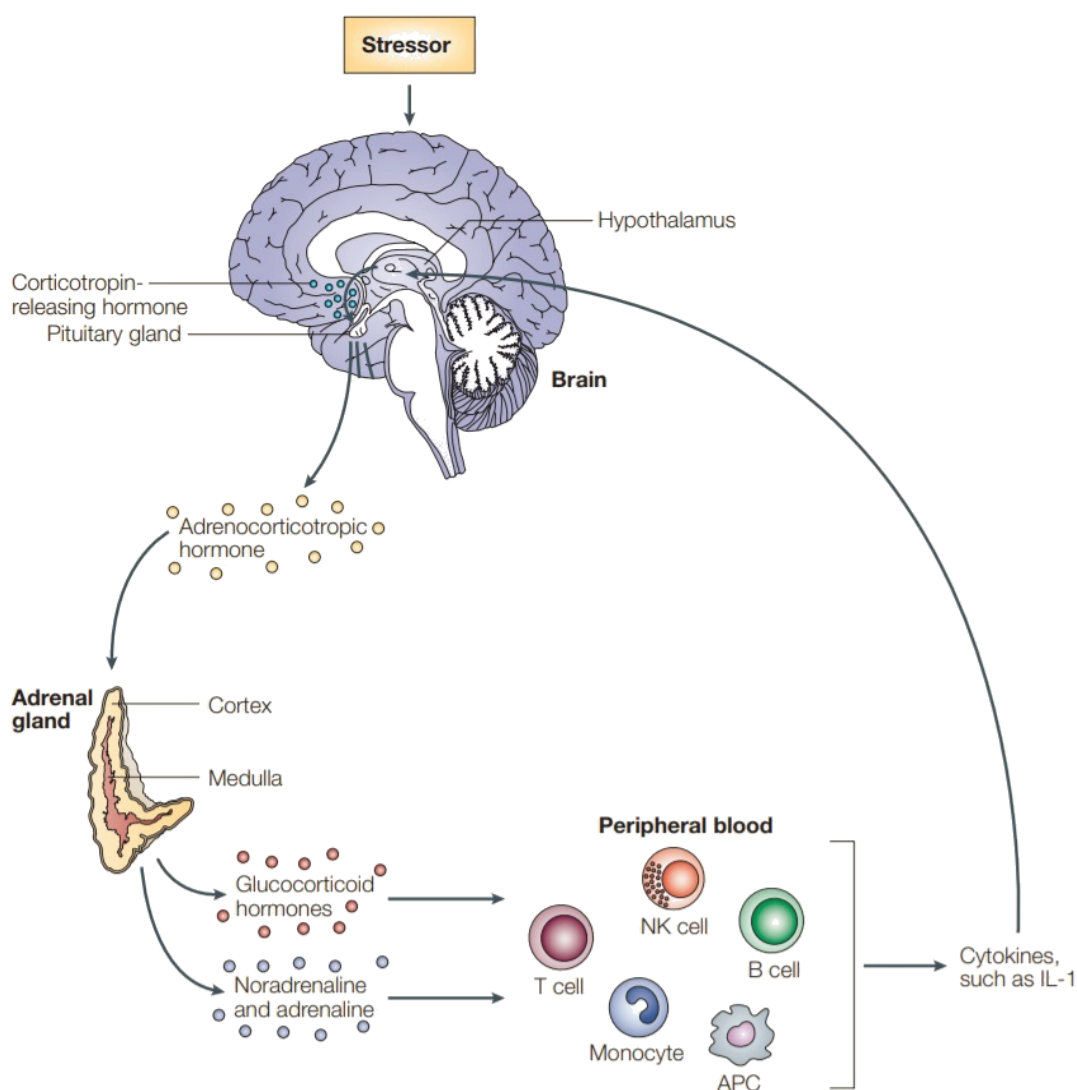
3.2.1 Vliv stresu na imunitní systém

Stres má na imunitní systém obousměrný efekt, jak supresivní, tak stimulační. Je schopný změnit schopnost migrace, proliferace i počet leukocytů či produkci cytokinů. Pokud je organismus vystaven akutnímu stresu, který trvá několik minut až hodin, mělo by ho to nabudit a zároveň stimulovat imunitní systém. Naopak pokud je organismus vystaven chronickému stresu, který může trvat mnoho hodin až měsíců, snižuje se aktivita metabolismu i imunitního systému (Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005; Dhabhar, 2008).

Jak vyplývá z předchozí kapitoly člověk, který je vystaven chronickému stresu, mývá často větší pravděpodobnost k onemocněním. Stres dysreguluje imunitní systém, potlačuje produkci cytokinů Th1 odpovědi, snižuje proliferaci a počet imunitních buněk a celkově působí imunosupresivně. Krysím samcům, kteří byli vystaveni sociálnímu stresu, se snížila proliferace a citlivost T-lymfocytů na konkanavalin A (ConA, concanavalin A) (Engler and Stefanski, 2003; Stefanski and Engler, 1998). Také bylo ukázáno, že stresované myši mají větší pravděpodobnost ke vzniku rakoviny. Tyto myši měly nižší hladiny IFN γ a TNF α , snížila se proliferace T-lymfocytů, počet CD4 $^{+}$ T-lymfocytů, a naopak se zvýšil počet Treg. Tím se zvýšila proliferace nádorových buněk a snížila pravděpodobnost přežití jedinců (Frick *et al.*, 2009; Saul *et al.*, 2005).

Naopak akutní stres má imunostimulační efekt. Podporuje proliferaci, migraci, zrání a funkci DC, neutrofilů, makrofágů a lymfocytů (Viswanathan and Dhabhar, 2005; Dhabhar, 2008). Po navození akutního stresu se zvýšil počet Th lymfocytů, paměťových T-lymfocytů a celková imunologická paměť. Dále se zvýšila produkce IL-2, IFN γ a TNF α (Dhabhar and Viswanathan, 2005). Taktéž bylo pozorováno, že akutní stres zvyšoval protein tepelného šoku (HSP, heat shock protein) 72, který zesiloval vrozenou imunitní odpověď. Tím se zvýšila sekrece NO makrofágy a prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6 a TNF α), což mělo za následek rychlejší baktericidní účinek a potlačování zánětu (Campisi and Fleshner, 2003).

Mediátory stresu působící na imunitní systém jsou endogenní faktory, mezi které patří neurotransmitery a stresové hormony – adrenalin, noradrenalin, glukokortikoidy a další. Tyto faktory mohou produkovat i samotné imunitní buňky. Imunitní buňky mohou prostřednictvím produkovaných endogenních stresových faktorů a cytokinů působit také na aktivitu hypotalamu (obr. 2) (Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005; Yaribeygi *et al.*, 2017).



Obrázek 2. HPA osa. Stresor působí na mozkový signální systém. Aktivuje se HPA osa v hypotalamu a spouští se sekrece kortikotropin uvolňujícího hormonu. Ten aktivuje sekreci adrenokortikotropního hormonu v přední hypofýze, který stimuluje nadledviny k produkci stresových endogenních faktorů – adrenalinu/noradrenalinu a glukokortikoidů. Tyto faktory dále působí i na buňky imunitního systému, které dále mohou produkovat cytokiny, které mohou zpětně ovlivnit HPA osu (převzato a upraveno z Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005).

3.3 Stresové endogenní faktory

3.3.1 Glukokortikoidy

GCs jsou steroidní stresové hormony. Jejich syntéza probíhá v kůře nadledvin, která je dělena do tří vrstev – *zona glomerulosa*, *zona fasciculata* a *zona reticularis*. V *zona glomerulosa* se syntetizují mineralokortikoidy, které se podílí na iontové rovnováze. V *zona fasciculata* se syntetizují GCs, které ovlivňují metabolismus cukru (Heming *et al.*, 2018). GCs jsou uvolňované pravidelně v rámci cirkadiálního rytmu nebo prostřednictvím HPA po vystavení organismu stresu. Nejvýznamnějším glukokortikoidem člověka je kortizol a v případě hladovců je to kortikosteron (CO, corticosterone). (Nomura *et al.*, 1997; Cain and Cidlowski, 2017). Existují také syntetické GCs, které se díky svým imunosupresivním a protizánětlivým účinkům využívají v léčbě různých onemocnění. Mezi ně patří například dexametazon (DEX, dexamethasone) a prednison.

GCs působí na buňky prostřednictvím vazby na specifické receptory pro glukokortikoidy, které jsou dvojího typu glukokortikoidové receptory (GR, glucocorticoid receptors) a mineralokortikoidové receptory (MR, mineralocorticoid receptors). Oba typy patří do superrodiny nukleárních receptorů transkripčních faktorů. GCs se vážou s větší afinitou na GR (Timmermans, Souffriau and Libert, 2019; Huang, Chandra and Rastinejad, 2010).

3.3.1.1 Glukokortikoidy a imunitní systém

GCs mají supresivní efekt na zánětlivou odpověď imunitního systému. To je způsobeno interakcí GR a prozánětlivých transkripčních faktorů NF κ B a AP-1. GR inhibují expresi mnoha molekul, které se účastní zánětlivé reakce. Konkrétně potlačují expresi adhezivních molekul, které umožňují imunitním buňkám migrovat skrz endotel – intracelulární adhezivní molekuly 1 (ICAM-1, intracellular adhesive molecule 1) a vaskulární adhezivní molekuly 1 (VCAM 1, vascular cell adhesion molecule) (Heming *et al.*, 2018). Dále snižují počet DC, monocytů, granulocytů a lymfocytů a produkci IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-6 a IL-17 (Varga *et al.*, 2014; van der Velden, 1998). Varga *et al.* ukázali, že monocyty stimulované GCs získávají protizánětlivý fenotyp. Tyto monocyty potlačovaly proliferaci CD8⁺ i CD4⁺ lymfocytů a produkci jejich cytokinů, a naopak podpořily proliferaci Foxp3⁺ lymfocytů. To mělo za následek, že se u myši po podání monocytů ovlivněných GCs snížily projevy kolitidy indukované T-buňkami (Varga *et al.*, 2014).

Avšak GCs mohou při akutním stresu působit i prozánětlivě (Cruz-Topete and Cidlowski, 2015). U myši, která byla vystavena akutnímu, byla detekována zvýšená imunitní odpověď a hypersenzitivita opožděného typu. Opačný efekt byl pozorován při vystavení chronickému stresu (Dhabhar and McEwen, 1997).

3.3.2 Katecholaminy

Katecholaminy jsou látky odvozené od tyrosinu. Syntetizovány jsou v dřeni nadledvin a v mozku. Patří sem dopamin, adrenalin a noradrenalin. Adrenalin (AD, adrenaline) s noradrenalinem (NE, norepinephrine) fungují jako neurotransmitery centrální a periferní nervové soustavy a jako stresové hormony jsou produkované chromafinními buňkami dřene nadledvin. AD působí v těle jako hlavní stresový hormon, který připravuje organismus na zátěžovou situaci. NE působí jako hlavní neurotransmitter autonomních sympatetických postgangliových nervových vláken (Marino and Cosentino, 2013). Dopamin patří do katecholaminů spíše z chemického hlediska, a kvůli jeho afinitě k adrenergním receptorům (AR, adrenergic receptor). Katecholaminy mají mnoho funkcí v organismu jako jsou kontrakce a relaxace hladkého a srdečního svalstva, snížení sekrece inzulínu, lipolýza, glykogenolýza či imunomodulační účinky (Paravati and Warrington, 2019).

Efekt katecholaminů je zprostředkován AR, které patří do skupiny membránových receptorů spřažených s G-proteinem. Dělí se do dvou typů – α a β AR. Podle G proteinu, se kterým jsou spřažené, se α AR dále dělí na α_1 AR, spřažené s G_q proteinem a α_2 AR spřažené s G_i proteinem. Vazba ligandu na α_1 AR aktivuje fosfolipázu C (PLC, phospholipasa C) a dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . G_i protein inhibuje adenylátcyklázu (AC, adenylatecyclase) a tím snižuje koncentraci cAMP. β AR se dále dělí na β_{1-3} AR, spřažené s G_s proteinem. β_{2-3} AR jsou spřažené s G_i proteinem, ale oproti α_2 AR aktivují adenylátcyklázu a zvyšují koncentraci cAMP. AR se nachází na všech lidských buňkách, avšak s různou expresí – např. T-lymfocyty mají nižší expresi β_2 AR než B-lymfocyty. Katecholaminy mají odlišnou afinitu k AR – AD vykazuje vyšší afinitu k β AR a NE má vyšší afinitu k α AR (Marino and Cosentino, 2013; Ciccarelli *et al.*, 2013; Tyurin-Kuzmin *et al.*, 2016).

Tabulka 1. Rozdělení adrenergických receptorů. PLC – fosfolipáza C, IP3 – inositoltrifosfát, AC – adenylátcykláza

Receptor	Signalizace	Účinek
α_1	G _q ; ↑ PLC; ↑ IP3 a Ca ²⁺	Kontrakce hladkého svalstva
α_2	G _i ; ↑ AC; ↓ cAMP	Kontrakce hladkého svalstva
β_1	G _s ; ↑ AC; ↑ cAMP	Kontrakce srdečního svalu
β_2	G _s ; ↑ AC; ↑ cAMP	Relaxace hladkého svalstva
β_3	G _s ; ↑ AC; ↑ cAMP	Lipolýza

3.3.2.1 Katecholaminy a imunitní systém

Bylo prokázáno, že stimulace AR prostřednictvím NE či AD snižuje aktivitu NK buněk a lymfocytů (Marino and Cosentino, 2013). V další studii stimulace MSCs pomocí AD polarizovala monocyty v protizánětlivý fenotyp, především byla pozorována inhibice exprese makrofágového zánětlivého proteinu MIP-1. Stejný efekt byl pozorován u stimulace MSCs agonistou β AR, naopak u stimulace agonistou α AR byl tento efekt minimální (Li *et al.*, 2003). Po stimulaci β AR na monocyttech byla také snižená exprese ICAM-1, produkce IFN γ , TNF α či IL-12 (Takahashi *et al.*, 2003). Stejný efekt pozoroval Agac *et al.* Stimulace NE snížila produkci zánětlivých cytokinů TNF α , IL-12, IL-6 a IL-1 β buňkami nespecifické imunity a naopak zvýšila produkci protizánětlivého IL-10 (Agac *et al.*, 2018).

Existují studie, které NE přičítají i imunostimulační efekt (Sanders and Straub, 2002). Bylo prokázáno, že po vystavení stresu došlo u mužů ke zvýšení počtu neutrofilů a monocytů. Tento efekt byl zprostředkován vazbou NE na α AR zvýšil (Beis *et al.*, 2018). Dále NE dokázal zvýšit hladinu IL-2 a IFN γ a aktivitu NK buněk (Kappel *et al.*, 1998). V jiné studii byla měřena aktivita lymfocytů stimulovaných NE a dopaminem. Oba faktory zvýšily aktivitu lymfocytů společně s produkcí Th1 i Th2 cytokinů. Avšak kombinace NE společně s DEX měla na lymfocyty i cytokiny imunosupresivní účinek jako stimulace samotným DEX (Torres *et al.*, 2005).

Jak je vidět, funkce NE závisí nejspíše na více faktorech a na typu AR, přes které působí na imunitní buňky. NE ve vysokých koncentracích působí prostřednictvím β AR, přestože za normálních podmínek vykazuje vyšší afinitu k α AR.

3.4 Vliv stresových endogenních faktorů na MSCs

Organismus reaguje na stres uvolňováním endogenních faktorů, které fungují jako mediátory stresu. Jejich prostřednictvím má stres vliv na regeneraci tkání, imunitní systém či metabolické pochody. Při chronickém stresu se organismus vyčerpává, což má negativní vliv na metabolismus, schopnost regenerace tkání i imunitu. Ovšem krátkodobé vystavení stresu organismus nabudí a pozitivně ovlivňuje zmíněné procesy. Lze tudíž předpokládat stejný vliv stresu na schopnosti a funkce MSCs. Tyto buňky produkují mnoho molekul podílejících se na udržování homeostáze, regeneraci tkání či modulaci imunitního systému. *Yang et al.* ukázali, že chronický stres negativně ovlivnil diferenciaci MSCs v myofibroblasty a redukoval expresi α aktinu hladkého svalstva prostřednictvím inhibice TGF β . (*Yang et al.*, 2014).

Pomocí endokrinních a nervových signálů jsou regulovány schopnosti MSCs. Signály zprostředkovávají právě např. stresové faktory působící prostřednictvím specifických receptorů, které se nacházejí na mnoha buňkách včetně MSCs. Bylo prokázáno, že MSCs exprimují AR i GR (*Tyurin-Kuzmin et al.*, 2018b; *Carcamo-Orive et al.*, 2010). Studie zabývající se vlivem katecholaminů a glukokortikoidů na MSCs se zaměřují především na diferenciační, migrační a regenerační schopnosti, které hrají důležitou roli v terapeutickém potenciálu buněk.

3.4.1 Vliv katecholaminů na MSCs

MSCs exprimují AR, na které se váží katecholaminy sympatické nervové soustavy. Pomocí průtokové cytometrie byly zjištěny na povrchu MSCs všechny typy AR, ovšem míra exprese jednotlivých typů AR se lišila mezi dárci. Po stimulaci MSCs noradrenalinem byla zjištěna zvýšená exprese α_{1A} AR (*Tyurin-Kuzmin et al.*, 2018b; *Kotova et al.*, 2014).

Zajímavým pozorováním je, že po stimulaci MSCs noradrenalinem vzniklo šestihodinové okno, kdy buňky byly citlivější na další dávky katecholaminů. V tomto okně buňky reagovaly na stejnou koncentraci noradrenalinu uvolněním dvojnásobného množství

Ca^{2+} než buňky stimulované pouze jednou. Tento jev se nazývá heterologní senzibilizace a je způsobena změnou signalizace z β AR na α_1 AR. Tato změna může způsobit nejen zvýšenou citlivost vůči katecholaminům, ale může zvýšit sekreci různých molekul MSCs (Tyurin-Kuzmin *et al.*, 2016). Heterologní senzibilizaci lze pozorovat u primárních MSCs, ale i u embryonálních buněk, avšak ne u immortalizovaných MSCs (Tyurin-Kuzmin *et al.*, 2018a).

Dále bylo zjištěno, že signální dráhy AR a TLR2 v MSCs se navzájem propojují a ovlivňují. TLR2 hraje důležitou roli v rozpoznávání bakteriálních patogenů. Kombinace stresu s bakteriemi v ráně může být jedním z důvodů špatného procesu hojení. Pokud byly MSCs ovlivněny agonistou AR, zvýšila se také exprese TLR2 a myeloidního diferenciačního faktoru MyD88. A naopak aktivace TLR2 zvýšila expresi β_2 AR. Současná stimulace TLR2 a AR snížila migraci MSCs, naopak se zvýšilo uvolňování prozánětlivého IL-6 neonatálními keratinocyty a MSCs. U stresovaných myší se snížila schopnost hojení ran (Dasu *et al.*, 2014).

V poškozených tkáních se uvolňuje velké množství cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a dalších molekul. To vede k aktivaci a následné migraci MSCs do místa poškození. Avšak proces migrace MSCs není dosud zcela objasněn. Jedním z mechanismů je interakce chemokinového receptoru CXCR4 s chemkinem CXCL12 známým jako faktor stromálních buněk 1 (SDF-1, stromal cell-derived factor 1), který působí jako silný chemoatraktant kmenových buněk a hraje důležitou roli při regeneraci tkání. Bylo zjištěno, že NE inhiboval chemotaxi MSCs z perivaskulárních míst na základě koncentračního gradientu SDF-1 (Wu *et al.*, 2016).

Jak již bylo zmíněno, jedním ze způsobů, kterým se MSCs podílejí na regeneraci tkání, je diferenciace ve specifické buňky jako jsou adipocyty, chondrocyty a osteocyty. NE a další agonisti β AR způsobují v organismu termogenezi a lipolýzu. Hladiny mRNA a proteinu β_2 a β_3 AR jsou v procesu adipogeneze MSCs za normálních okolností zvýšené. Se zvyšujícími se koncentracemi agonisty β AR byl potlačován vývoj adipocytů z MSCs. Vystavením MSCs antagonistům β AR po dobu 7 dní mělo naopak za následek zvýšení počtu adipocytů vůči kontrole. Lze tedy vyvodit, že agonisti β AR uvolňovaní během stresu mají negativní efekt na diferenciaci MSCs v adipocyty (Li *et al.*, 2010b).

Dalším procesem, na kterém se MSCs podílejí je osteogeneze a chondrogenese. Osteoporóza či zlomenina kostí má chronický průběh a pacienti jsou vystaveni stresové situaci. MSCs slouží jako zdroj osteochondrálních progenitorů. Migrují na místo poškození, proliferují a diferenciují do chrupavek a kostí. Tím napomáhají obnově kostní a chrupavčité tkáně, avšak stres tento proces hojení zpomaluje. Při osteogenezi jsou stejně jako při adipogenezi zapojeny β_2 a β_3 AR. Za normálních podmínek se v průběhu osteogeneze zvyšuje exprese β_2 AR. Při použití agonisty β AR byla potlačena mineralizace MSCs a celkový vývoj osteocytů, jak v závislosti na koncentraci, tak délce podávání stimulace (Li *et al.*, 2010a). V další studii bylo ukázáno, že AD snížil expresi miRNA-21 inhibicí acetylace histonu a došlo ke snížení exprese osteogenních markerů. Lze tedy říci, že AD potlačuje osteogenní diferenciaci MSCs (Chen and Wang, 2017).

MSCs se společně s progenitorovými buňkami chondrocytů podílejí také na obnově chrupavčité tkáně. V synoviální tekutině získané po operaci kloubu byly zjištěny vysoké koncentrace NE (10^{-9} – 10^{-7} M). V těchto koncentracích NE působí prostřednictvím β AR. Stimulace pomocí NE snížila vývoj chondrocytů z MSCs a progenitorových buněk. Dále došlo ke snížení syntézy kolagenu II. typu a glykosaminoglykanů a k inhibici exprese chondrogenického transkripčního faktoru SOX9. Naopak se zvýšila exprese dvou heterotrofických faktorů – kolagenu typu X. a matrix metaloproteinázy 13 (Jenei-Lanzl *et al.*, 2014). Podobný efekt byl prokázán na chondrocytech. Po vystavení buněk AD se prostřednictvím β_2 AR snížila exprese Sox6 a Sox9 (Takarada *et al.*, 2009).

Katecholaminy uvolňované během stresu inhibují diferenciační potenciál MSCs prostřednictvím signalizační cesty cAMP/protein kináza A. Lze tedy předpokládat, že při adipogenezi, osteogenezi a chondrogenese hrají β AR roli v regulaci exprese genů nezbytných v daných diferenciačních procesech.

Nedávno bylo ukázáno, že jeden ze způsobů regulace diferenciačního potenciálu MSCs je prostřednictvím senzického nervu, který je zapojen do vývoje kostní tkáně. Prostřednictvím PGE2 uvolňovaného osteoblasty se aktivuje receptor senzického nervu EP4 a zároveň je potlačena sympatická aktivita, což má za následek tvorbu kostní tkáně. MSCs izolované z myši s inaktivovaným receptorem EP4 vykazovaly oproti wild-type myši zvýšenou diferenciaci do adipocytů a sníženou diferenciaci do osteoblastů. Injekcí molekuly SW033291, která zvyšuje hladinu PGE2, či propranololu, který blokuje β AR, se zvýšila

osteogeneze a snížila adipogeneze u wild-type myši. Senzorický nerv pravděpodobně udržuje rovnováhu mezi osteogenezí a adipogenezí MSCs (Hu *et al.*, 2020).

3.4.2 Vliv glukokortikoidů na MSCs

MSCs exprimují kromě AR také GR, které hrají roli v diferenciaci a dalších funkcích MSCs. GCs prodlužují dobu hojení nejenom supresivním efektem na imunitní buňky, ale i inhibicí migrace či diferenciaci MSCs. V různých studiích se často používají syntetické glukokortikoidy např. DEX.

GCs mají také vliv na diferenciační schopnosti MSCs. Je známo, že syntetické glukokortikoidy podávané pacientům působí imunopresivně a mají negativní vliv na regeneraci kostní tkáně. Tento efekt je znám jako osteoporóza indukovaná GCs. Vedle osteoporózy, mají pacienti také vyšší počet adipocytů (Li *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že vysoká koncentrace DEX ($c = 10^{-5}$ M) snižuje potenciál MSCs diferenciovat se do osteoblastů (Zhou *et al.*, 2014). Stimulací DEX se potlačila exprese markerů osteogeneze. DEX také inhiboval expresi histon deacetylázy 6 (HDAC6, histone deacetylase 6). Zároveň bylo pozorováno, že tento efekt koreloval se sníženou expresí GR. Je zajímavé, že pokud se inhibovala exprese GR společně s expresí HDAC6, tak se zvýšila exprese osteoblastového markeru (Rimando *et al.*, 2016).

Opačný efekt byl pozorován v jiné studii. V ní byl použit DEX v nižší koncentraci (10^{-7} M). DEX indukoval proliferaci a osteogenní diferenciaci MSCs. Expese genů spojených s osteogenezí se po stimulaci DEX zvýšila. Dále se zvýšila expese u miRNA, které se účastní osteogenní diferenciaci. Lze tedy vyvodit, že vysoké koncentrace GCs, které jsou přítomné při stresu, negativně ovlivňují diferenciační schopnosti MSCs a mohou způsobovat patologickou osteoporózu (Bian *et al.*, 2015).

V další studii byl pozorován vliv hydrokortizonu na MSCs. Bylo zjištěno, že působení tohoto GC nemá vliv na geny spojené s morfogenezí a imunomodulačními vlastnostmi MSCs. Dále byly sledované geny pro osteogenzi a adipogenezi. Po stimulaci se zvýšila expese pozdního adipogenního markeru PPAR γ . Při vzrůstajícím počtu pasáží a délece stimulace hydrokortizonem se snížila expese BGLAP a vymizela expese SPP1 (Shipunova, Petinati and Drize, 2013).

Chronický stres působí negativně na migraci MSCs a způsobuje delší hojení poranění. V myším modelu jaterní fibrózy způsobil stres zvýšenou hladinu CO v séru. Pohyb myši byl omezen umístěním do kónických centrifugačních zkumavek. Během této stresové situace jim nebyla podávána potrava či voda. Kontrolní skupina myši byla ponechána v klecích a mohla se volně pohybovat. CO snížil migraci MSCs, která byla indukována SDF-1, do místa poškození. Stimulace MSCs prostřednictvím CO snížila také expresi chemokinového receptoru CXCR4 a CXCR7. Stres ovšem neměl vliv na samotnou sekreci SDF-1 a HGF. Zároveň antagonisti AR metyrapon a RU486 utlumili negativní vliv CO na migraci buněk. (Zhang *et al.*, 2015).

Kromě SDF-1 jsou pro migraci a léčbu poranění důležité další faktory. Kato *et al.* prokázali, že stimulací MSCs pomocí DEX se snížila exprese SDF-1, HGF a KGF. Dále bylo ukázáno, že MSCs získané od pacientů s osteoporózou, kteří byli podrobena glukokortikoidové terapii, měli taktéž sníženou expresi SDF-1. DEX tedy snížil schopnost migrace MSCs (Kato *et al.*, 2017).

Pacienti s pánevním nádorem mývají poškozenou sliznici střeva ionizujícím zářením, které se využívá při léčbě nádorů. Po podání jedné dávky MSCs bylo pozorováno snížené poškození sliznice tlustého střeva a byla zlepšena reepitelizace tkáně. MSCs inhibují infiltraci T-lymfocytů a zvyšují apoptózu T-lymfocytů, které byly aktivované zářením. Dále byla 21 dní po podání MSCs zvýšená sekrece CO. Avšak po blokaci GR molekulou RU486 se zvýšila proliferace alogenních lymfocytů, kde byla původně inhibována MSCs. Ve výsledku antagonist GR zrušil protektivní imunosupresivní funkci MSCs (Bessout *et al.*, 2014).

Tabulka 2. Přehled účinků různých stresových faktorů na MSCs. ISO - isoproterenol hydrochlorid, NE – noradrenalin, AD – adrenalin, DEX – dexametazon, HCO – hydrokortizon, CO – kortikosteron, SDF-1 – faktor stromálních buněk 1

Faktor	Efekt na MSCs	Studie
ISO	↓ adipogeneze, osteogeneze	Liu <i>et al.</i> , 2010a/b
NE	↓ osteogeneze, chondrogenese	Jenei-Lanzl <i>et al.</i> , 2014
NE	↓ migrace a chemotaxe k SDF-1	Wu <i>et al.</i> , 2016
AD	↓chondrogenese	Takarada <i>et al.</i> , 2009
NE a AD	↓ chondrogenese ↑ adipogeneze	Hu <i>et al.</i> , 2020
DEX (10 ⁻⁵ M)	↓ osteogeneze	Zhou <i>et al.</i> , 2014, Rimando <i>et al.</i> , 2016
DEX (10 ⁻⁷ M)	↑ osteogeneze	Bian <i>et al.</i> , 2015
HCO	↑ marker adipogeneze ↓ marker osteogeneze	Shipunova, Petinati and Drize, 2013
CO	↓ migrace a chemotaxe k SDF-1	Zhang <i>et al.</i> , 2015
DEX	↓ SDF-1, HGF, KGF	Kato <i>et al.</i> , 2017

Vzhledem k diferenciačním, imunomodulačním a regeneračním schopnostem MSCs se řada klinických studií v posledních letech zaměřuje na využití MSCs jako možné léčby. Konkrétně jsou MSCs studovány v souvislosti např. s hojením ran (An *et al.*, 2018), revmatoidní artritidou (Baharlou *et al.*, 2017), roztroušenou sklerózou (Laso-García *et al.*, 2018; Ryu *et al.*, 2013) či Crohnovou chorobou (Ciccocioppo *et al.*, 2011). Právě při těchto onemocněních či při hojení různých tkání se člověk ocitne ve stresové situaci. Ta má negativní vliv v procesu regenerace, na které se pro svoje schopnosti podílí i MSCs. Avšak vliv stresu a na samotné MSCs není dosud zcela objasněn a je potřeba ho dále prozkoumat.

4. Cíl práce

Stres narušuje homeostázu v těle. Akutní stres tělo nabudí a má spíše pozitivní vliv, naopak chronický stres tělo vyčerpává a má na něj negativní vliv. Organismus jako odpověď na stres produkuje stresové endogenní faktory, mezi které patří neurotransmitery a glukokortikoidy. Ty působí na řadu mechanismů v těle jako je například regenerace tkání, ve které hrají roli MSCs. Proto hypotézou této studie je, že stresové endogenní faktory působí prostřednictvím MSCs na schopnost regenerace tkání. Přičemž předpokládáme odlišný vliv akutního a chronického stresu na MSCs.

Cílem této práce je pozorovat vliv vybraných stresových endogenních faktorů na vlastnosti a funkce MSCs.

Konkrétně vliv noradrenalinu a kortikosteronu na MSCs:

- Přežívání
- Fenotyp
- Metabolickou aktivitu
- Diferenciaci
- Při stimulaci zánětlivými faktory
- Imunomodulační účinky MSCs na aktivované splenocyty

5. Metody a materiál

5.1 Zvířata

Na experimenty byly použity samice z myšího inbredního kmene BALB/c ve věku 8-12 týdnů. Zvířata byla získaná z Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky (ÚMG AV ČR).

5.2 Média a roztoky

Pro kultivaci a izolaci MSCs bylo použito DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, PAA Laboratories, Pasching, Austria), ke kterému bylo přidáno 10% fetální telecí sérum (FCS, fetal calf serum, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO USA – dále jen Sigma), 10 mM hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pufru (Sigma) a antibiotika - 100 mg/ml streptomycinu (Sigma) a 100 U/ml penicilinu (Sigma).

Pro kultivaci a izolaci splenocytů bylo použito RPMI (Roswell Memorial Park Institute 1640 medium, Sigma), ke kterému bylo přidáno 10% FCS, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanolu (Sigma), 10 mM hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) pufru (Sigma) a antibiotika – 100 mg/ml streptomycinu (Sigma) a 100 U/ml penicilinu.

Na pasážování buněk a cytometrickou analýzu byl použit 1x roztok fosfátového pufru (PBS, phosphate buffer solution).

Pro měření NO Griessovou reakcí byl připraven roztok A- 0,5 g sulfonylamidu (Sigma), 1,5 ml H_3PO_4 a 48,5 ml H_2O a roztok B – 0,15 g N-1-naphtylendiamin dihydrochlorid (Sigma), 1,5 ml H_3PO_4 , 48,5 ml H_2O .

Pro test imunoenzymatické reakce (ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay) byl jako promývací roztok PBS/Tween používán roztok připravený přidáním 0,5 ml Tween-20 (Sigma) do 1 l PBS. Jako koutovací roztok byl používán roztok, který byl připraven rozpuštěním 1,68 g $NaHCO_3$ (Sigma) v 200 ml sterilní H_2O . Jako blokovací byl používán roztok, který byl připraven přidáním 15 ml inaktivovaného FCS do 200 ml sterilního PBS.

5.3 Technické vybavení

Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)

Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Germany)

Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)

Laminární box CleanAir (Schoeller Instruments s.r.o., Praha, Česká republika)

Laminární box SafeFAST premium (DASITgroup, Cornaredo, Italy)

CO₂ inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan)

Spektrofotometr OpsysMR (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA)

Fluorescenční a optický mikroskop Leica Dmi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)

Průtokový cytometr LSR II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)

Průtokový cytometr Cytoflex (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

5.4 Software

Byly použity softwary pro

- práci se spektrofotometrem – Revelation Quicklink (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA)
- statistickou analýzu – GraphPad Prism8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)
- ovládání průtokového cytometru LSR II – FACSDiva Software (Becton, Dickinson and Company)
- vyhodnocování cytometrických dat z průtokového cytometru LSR II – GateLogic 400.2A (Invai, Mentone, Australia)
- ovládání a vyhodnocování dat z průtokového cytometru CytoFlex – CytExpert Software (Beckman Coulter)

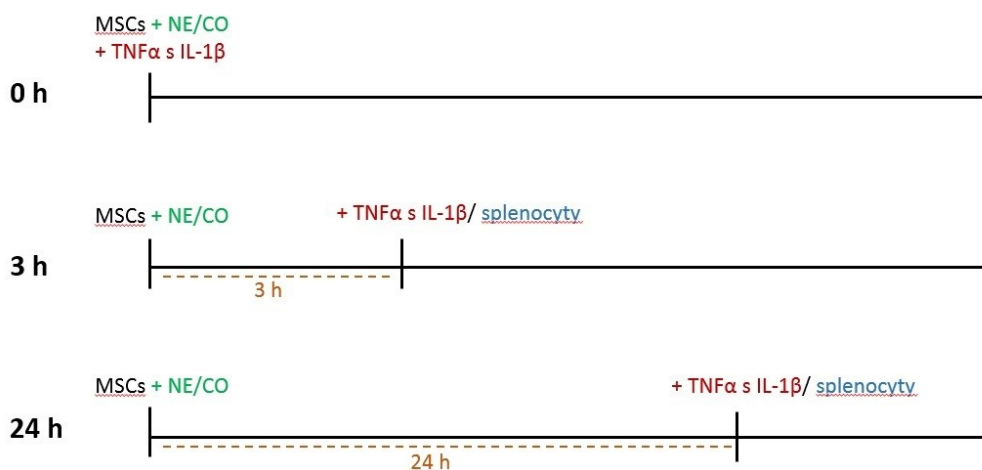
5.5 In vitro model

Pro tuto práci byl navržen *in vitro* model, který umožňoval studium vlivu stresových faktorů NE a CO či jejich kombinace na MSCs. Buňky byly ovlivňovány fyziologickými koncentracemi NE (10 μ M, Sigma) a CO (0,3 μ M, Sigma), které jsou přítomné za stresu. Tyto koncentrace jsou přibližně 10x vyšší při stresu než za normálních podmínek. Jako kontroly sloužily buňky, které nebyly ovlivněny stresovými faktory.

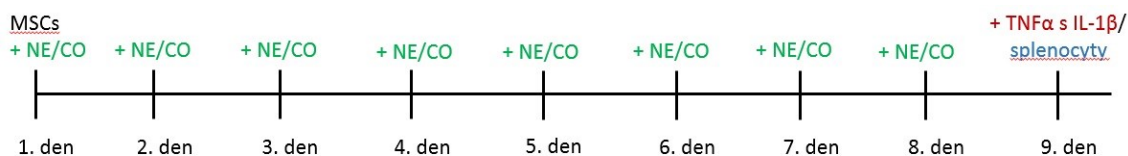
Pro model akutního stresu byly navrženy 3 skupiny – 0 hodin (0 h), 3 hodiny (3 h) a 24 hodin (24 h) (obr. 3). Ve skupině 3 h mělo být zachycené okno, ve kterém by buňky měly být dle zmíněné publikace citlivější na vnější mikroprostředí a kdy by měla zvýšená jejich parakrinní sekrece (Tyurin-Kuzmin *et al.*, 2016). Skupiny 0 h a 24 h sloužily jako kontrolní skupiny pro toto okno.

Ve skupině 0 h byly nasazeny MSCs do kultivačního média a ve stejný čas byly ovlivněny stresovými faktory a stimulovány zánětlivými cytokiny – TNF α (10 ng/ml, Peprotech, London, UK) a IL-1 β (10 ng/ml, Peprotech). V případě 3 h skupiny byly buňky ovlivněny stresovými faktory a po 3 hodinách k nim byly přidány zánětlivými cytokiny či splenocyty. U 24 h skupiny byly MSCs ovlivněny stresovými faktory a po 24 hodinách k nim byly přidány zánětlivé cytokiny či splenocyty.

V modelu chronického stresu byla navržena jedna skupina. MSCs byly nasazeny a po dobu 8 dní byly každý den ovlivňovány NE, CO či jejich kombinací. Zánětlivé cytokiny či splenocyty byly přidány 9. den (obr. 4).



Obrázek 3. Schéma modelu akutního stresu



Obrázek 4. Schéma modelu chronického stresu

5.6 Izolace a kultivace MSCs

Pro tuto práci byly použity MSCs získané z tukové tkáně myší kmene BALB/c. Abdominální tuková tkáň byla odebírána z oblasti třísel, kde před samotným odběrem tukové tkáně byla nejprve odstraněna mízní uzlina. Tuková tkáň byla mechanicky homogenizována a následně k ní byl přidán roztok 10% kolagenázy I (Sigma). Poté byla tato směs inkubována po dobu 60 minut při 37 °C. Směs byla přenesena do zkumavky, poté k ní bylo přidáno 7 ml PBS a následně byla směs centrifugována (25 °C, 4 minuty, 170 RCF). Po centrifugaci byla peleta přenesena do nové zkumavky, opět k ní bylo přidáno 7 ml PBS a dále byla centrifugována. Tento postup byl 3x opakován. Na závěr byla peleta resuspendována ve 4 ml DMEM a přenesena do kultivační láhve (BioLite), kde byl objem kultivačního média doplněn do objemu 12 ml. Po 48 hodinách byly buňky opláchnuty temperovaným DMEM za účelem omytí neadherentních buněk.

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C s 5 % oxidu uhličitého (CO₂, carbone dioxide) po dobu 3 týdnů. Při dosažení konfluentní vrstvy během kultivace byly buňky pasážovány. MSCs ze 3. nebo 4. pasáže byly použity k dalším experimentům.

5.7 Izolace splenocytů

Splenocyty byly izolovány ze slezin myší kmene BALB/c. Slezina byla mechanicky homogenizována a přefiltrována. Vzniklá suspenze byla přenesena do zkumavky, která byla následně centrifugována (8 °C, 8 minut, 170 RCF). Supernatant byl odlit a peleta resuspendována v RPMI. Takto izolované splenocyty byly dále využity k experimentům.

5.8 Kultivace MSCs se splenocyty

V rámci své práce jsem zjišťovala vliv MSCs na imunitní buňky při společné kultivaci. Bylo nasazeno 5x10⁴ MSCs společně s 1x10⁶ izolovanými splenocyty do 24jamkových kultivačních destiček (Nunc, Roskilde, Denmark) dle schémat (obr. č. 3 a 4). Dále byl přidán ConA (1,25 µg/ml, Sigma) pro stimulaci T lymfocytů. Buňky byly společně kultivovány v 1 ml kultivačního média v inkubátoru s CO₂ při 37 °C po dobu 48 a 72 hodin. Poté byly vzorky dále zpracovány pro měření vybraných znaků splenocytů pomocí průtokové cytometrie a pro měření hladin vybraných cytokinů pomocí ELISA testu.

5.9 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla použita pro detekci vybraných povrchových znaků a transkripčních faktorů. Vzorky byly připravovány z MSCs ovlivněných stresovými faktory dle schémat (obr. 3 a 4) či kontrolních MSCs kultivovaných za standartních podmínek. Dále byly měřeny splenocyty a pomocí průtokové cytometrie popsané v předchozí kapitole (5.8).

Celá příprava vzorků probíhala na ledu. Do jednotlivých jamek přidal vychlazený 1x PBS. Každá směs byla promíchána, přenesena do zkumavky a centrifugována (8 °C, 8 minut, 170 RCF). Poté byl odlit supernatant a byla resuspendována peleta. Jednotlivé suspenze byly přeneseny v objemu 200 µl do 96 jamkové destičky s kulatým dnem (Nunc). Destička se centrifugovala (8 °C, 3 minuty, 170 RCF) a poté se peleta rozvolnila pomocí třepačky.

K barvení byli použity monoklonální protilátky (mAb, monoclonal antibodies) konjugované s barevnými fluorochromy – fluorescein isothyokyanát (FITC, fluorescein isothyocyanate), fykoerytrin (PE, phycoerythrin), alofykocyanin (APC, allophycoyanine),

Alexa Fluor 700 (A700, Alexa Fluor 700). Pro značení mrtvých buněk byl použitý Hoechst 33258 (Sigma). V případě intracelulárního barvení byly nejprve obarveny povrchové znaky a mrtvé buňky byly obarveny Pacific Blue.

Barvení povrchových znaků probíhalo dle protokolu:

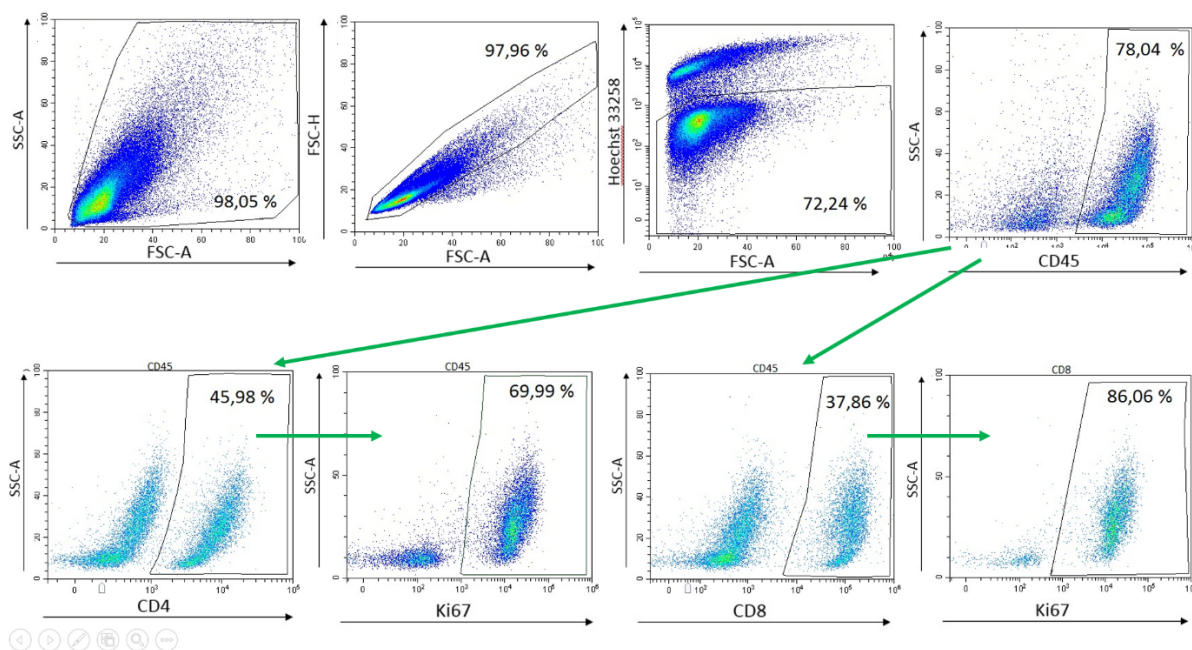
- 1) Přidat 10 μ l mAb naředěné v PBS
- 2) 30 min inkubace na ledu a ve tmě
- 3) 2x promýt pomocí 200 μ l PBS, centrifugace (8 °C, 3 minuty, 170 RCF)
- 4) Rozvolnit peletu
- 5) Přidat 200 μ l PBS pro měření
- 6) Těsně před měřením přidat Hoechst 33258
- 7) Měření

Barvení intracelulární znaků probíhalo dle protokolu:

- 1) Barvení povrchových znaků dle výše zmíněného protokolu
- 2) 30 minut fixace pomocí fixačního pufu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 3) 2x promýt pomocí 200 μ l permeabilizačního pufu (Invitrogen), centrifugace (23 °C, 4 minuty, 300 RCF)
- 4) Rozvolnit peletu
- 5) 30 minut permeabilizace a barvit pomocí mAb naředěné v permeabilizačním pufu
- 6) 2x promýt pomocí 200 μ l permeabilizačního pufu (Invitrogen), centrifugace (23 °C, 4 minuty, 300 RCF)
- 7) Rozvolnit peletu
- 8) Přidat 200 μ l permeabilizačního pufu
- 9) Měření

Tabulka 3. Seznam použitých monoklonárních protilátek v průtokové cytometrii

Znak	Fluorochrom	Ředění	Klon	Výrobce	Značení
CD45	A700	1:200	30-F11	Biolegend	povrch
CD45	FITC	1:200	30-F11	Biolegend	povrch
CD4	FITC	1:160	GK1.5	Biolegend	povrch
CD8a	APC	1:160	53-6.7	Biolegend	povrch
CD69	PE	1:120	H1.2F3	Biolegend	povrch
CD31	PE	1:50	390	Biolegend	povrch
CD11b	APC	1:50	M1/70	Biolegend	povrch
CD90.2	FITC	1:50	30-H12	Biolegend	povrch
CD105	PE	1:50	MJ7/18	Biolegend	povrch
CD73	PE	1:50	eBioTY/118	Biolegend	povrch
CD44	FITC	1:50	IM7	Biolegend	povrch
Ki67	PE	1:160	16A8	Biolegend	intracelulární
FoxP3	APC	1:100	FJK-16S	Invitrogen	intracelulární
RORγ	PE	1:80	AFKJS-9	eBioscience	intracelulární



Obrázek 5. Ukázka gateovací strategie na splenocytech.

5.10 Měření NO

Produkce NO byla měřena z nestimulovaných nebo stimulovaných MSCs. Buňky byly nasazeny a ovlivněny podle schématu (obr.č. 3 a 4) do 48jamkových kultivačních destiček. Do 700 μ l bylo nasazováno $1,4 \times 10^5$ buněk pro model akutního stresu a kultivace trvala 72 hodin. Pro model chronického stresu bylo nasazeno $3,5 \times 10^4$ buněk a kultivace trvala 11 dní. Po uplynutí doby kultivace bylo odebráno 100 μ l supernatantu do 96jamkové destičky. Pomocí Griessovy reakce byl stanoven obsah NO. Jako standard byl použit roztok NaNO₃ (Sigma) a jako blank kultivační médium DMEM. Ke vzorkům bylo přidáno 50 μ l roztoku A a 50 μ l roztoku B. Poté byly vzorky měřeny pomocí spektrofotometru při vlnové délce 570 nm.

5.11 ELISA test

Pomocí ELISA testu byla měřena produkce IL-6 stimulovaných či nestimulovaných MSCs. Buňky v destičkách byly nasazeny a ovlivněny podle schématu (obr.č. 3 a 4) do 48jamkových kultivačních destiček. Do 700 μ l bylo nasazováno $1,4 \times 10^5$ buněk pro model akutního stresu a kultivace trvala 72 hodin. Pro model chronického stresu bylo nasazeno $3,5 \times 10^4$ buněk a kultivace trvala 11 dní. Po uplynutí doby kultivace byl odebrán supernatant. Pro měření hladiny IL-6 byla použita specifické protilátka ELISA BD Pharmingen (BD Pharmingen, San Diego, MA, USA). Na vzorky byly použity 96 jamkové destičky Immunoplate (SPL Life Sciences). Vzorky byly zpracovány dle protokolu:

- 1) Nanést 50 μ l primární protilátky (naředěné v koutovacím roztoku na požadovanou koncentraci), inkubace přes noc v chladu
- 2) 3x promýt pomocí PBS/Tween
- 3) Nanést 200 μ l blokovacího roztoku - inkubace 2-5 hodin při pokojové teplotě
- 4) 4x promýt pomocí PBS/Tween
- 5) Nanést 100 μ l vzorků, standartů a blanku – inkubace přes noc při pokojové teplotě
- 6) 6x promýt pomocí PBS/Tween
- 7) Nanést 100 μ l sekundární protilátky (naředěné v blokovacím roztoku na požadovanou koncentraci) – inkubace 1 hodinu
- 8) 6x promýt pomocí PBS/Tween
- 9) Přidat roztoku blokovacího roztoku s peroxidázou (roztok připraven přidáním 25 μ l peroxidázy do 10,5 ml blokovacího roztoku) – inkubace 1 hodinu

- 10) 8x promýt pomocí PBS/Tween
- 11) Přidat 100 µl roztoku substrátu s H₂O₂ (připraven přidáním 13 µl H₂O₂ do 10,5 ml substrátu)

Měření koncentrace probíhalo pomocí spektrofotometru OpsyssMR při měřicí vlnové délce 405 nm a referenční vlnové délce 630 nm.

Produkce IL-2 byla měřena ze splenocytů kultivovaných společně s MSCs popsané v kapitole 5.8. Pro měření hladin cytokinů IL-2 ze supernatantu byl použit kit DuoSet ELISA Development Systém (R&D Systém, Minneapolis, NY, USA). Na vzorky byly použity 96 jamkové destičky Immunoplate (SPL Life Sciences). ELISA test byl proveden dle protokolu:

- 1) Nanést 100 µl primární protilátky (naředěné v PBS na požadovanou koncentraci od výrobce) a inkubace přes noc v pokojové teplotě
- 2) 3x promýt pomocí PBS/Tween
- 3) Blokovat pomocí 200 µl Reagent diluentu 1 hodinu
- 4) 3x promýt pomocí PBS/Tween
- 5) Přidat 100 µl vzorků, blanku a standardů - inkubace 2 hodiny
- 6) 3x promýt pomocí PBS/Tween
- 7) Přidat 100 µl sekundární protilátky (naředěné v Reagent diluentu na požadovanou koncentraci od výrobce)
- 8) 3x promýt pomocí PBS/Tween
- 9) Přidat 100 µl Streptavidin HRP, inkubace 20 minut ve tmě
- 10) 3x promýt pomocí PBS/Tween
- 11) Přidat 100 µl Substrátu (reagent A : reagent B 1:1), inkubace 20 minut ve tmě
- 12) Zastavit reakci přidáním 50 µl 2N kyseliny sírové H₂SO₄

Měření koncentrace probíhalo pomocí spektrofotometru OpsyssMR při měřicí vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 570 nm.

5.12 PCR

Expresi vybraných genů byla zjišťována z MSCs, které byly kultivovány v 6jamkových kultivačních destičkách (Nunc). MSCs byly nasazeny a ovlivněny podle schématu (obr.č. 3 a 4). Pro model akutního stresu bylo nasazeno 1×10^6 buněk a kultivace probíhala 72 hodin. Pro model chronického stresu bylo nasazeno 2×10^5 buněk a kultivace trvala 11 dní. Po uplynutí kultivační doby bylo odebráno médium a byla izolována mRNA z jednotlivých vzorků podle protokolu:

- 1) Přidat 500 μ l TRI reagent[®] (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)
- 2) Pipetou přenést TRI reagent[®] s buňkami do RNase/DNase-Free mikrozkušavky
- 3) Přidat 2 μ l Polyacryl Carrier (Molecular Research Center)
- 4) Třepat, nechat stát 5 minut při pokojové teplotě
- 5) Přidat 100 μ l chloroformu
- 6) Třepat, nechat stát 2 minuty při pokojové teplotě
- 7) Centrifugace v chladu (14000x g, 15 minut)
- 8) Odebrat 200 μ l horní fáze do RNase/DNase-Free mikrozkušavky
- 9) Přidat 250 μ l isopropanolu
- 10) Třepat, nechat 5 minut stát při pokojové teplotě
- 11) Centrifugace v chladu (14000x g, 8 minut)
- 12) Odlít roztok z mikrozkušavky
- 13) Přidat 180 μ l 70% ethanolu
- 14) Centrifugace na centrifuze MiniSpin (10000x g, 1 minuta)
- 15) Odsát ethanol a vzorky nechat vyschnout od zbytků ethanolu v ohřívací třepačce 5 minut při 37 °C
- 16) Po vysušení přidat 20 μ l RNase-free H₂O
- 17) Nechat rozpustit peletu v H₂O a promíchat

RNA byla uchovávána v - 80 °C a její čistota a koncentrace byla zjištěna pomocí spektrofotometru Nanodrop. Čistota RNA byla zjišťována i vizuálně pomocí gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu s ethidiumbromidem. RNA byla dále přepsána do DNA pomocí reverzní transkripce.

Reverzní transkripce byla provedena kitem SuperScript III RT (Invitrogen, Praha, Česká republika) dle protokolu od výrobce:

- 1) Na 1 μg RNA přidat 1 μl deoxynukleotidů (Invitech) a 1 μl náhodných hexamerů (Promega)
- 2) Inkubace v ohřívací třepačce 5 minut při 65 °C
- 3) Přenést na led
- 4) Přidat 1 μl SuperScript III RT, 4 μl 5x First Strand buffer, 1 μl 0,1 M DTT a 1 μl RNas inhibitoru
- 5) Vzorky vložit do thermocycleru s nastaveným programem – 25 °C 5 minut, 50 °C 60 minut, 75 °C 15 minut)

Získaná cDNA byla uložena do -20 °C a dále použita pro PCR. Pro metodu PCR byly použity specifické forward a reverse primery a PPP Master Mix (Top-Bio, s.r.o. Vestec, Česká republika). Do mikrozkušavky bylo k 1,5 μl vzorku DNA přidáno 4,5 μl autoklávané vody, 6 μl PPP Master Mix a po 1 μl obou primerů. Poté byla mikrozkušavka vložena do thermocycleru s nastaveným programem – 95 °C 2 minuty, 94 °C 20 sekund, 60 °C 20 sekund, 72 °C 20 sekund. Tento program se opakoval v počtu cyklů dle zvoleného genu. Poté následovalo v thermocycleru dalších 10 minut při 72 °C. Po dokončení PCR byly vzorky okamžitě zchlazeny. Genová exprese byla zjišťována vizuálně pomocí gelové elektroforézy na 2% agarózovém gelu, do kterého byl přimíchán ethidiumbromid.

5.13 WST test

WST test, pomocí kterého se měří aktivita dehydrogenáz, byl použit na MSCs, které byly kultivované ve 200 μl v 96jamkové destičce. Ve 48hodinové kultivaci byly MSCs nasazeny v počtu 6000 buněk a ovlivněny NE, CO či jejich kombinací. V případě chronické kultivace byly MSCs nasazeny v počtu 2000 buněk a každý den po dobu 7 dní k nim byl přidáván NE, CO a jejich kombinace. Buňky byly kultivovány v inkubátoru s CO₂ při 37°C. Po uplynutí kultivační doby byl přidán WST-1 reagent (Sigma) v koncentraci 1:10 a vzorky byly inkubovány hodinu v inkubátoru s CO₂ při 37°C. Po inkubaci byly vzorky měřeny pomocí spektrofotometru OpsyssMR při měřící vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 630 nm.

5.14 Mikroskopie MSCs

Na dno 24 jamkové destičky bylo vloženo sterilní mikroskopické krycí sklíčko. Dále byly do jamky přidány MSCs v počtu 1×10^4 buněk. Buňky byly ponechány v 700 μ l 10% DMEM. Po dosažení konfluence byl k buňkám přidán NE či CO a po uplynutí 3 hodin byly buňky opláchnuty PBS. Následně byly fixovány 40 minut 4% roztokem paraformaldehydu. Po fixaci byly buňky opláchnuty PBS a poté 3x po 10 minutách ponechány v 0,2% roztoku Triton X-100 (Sigma) v PBS. Poté následovalo barvení pomocí phalloidinu (konjugován s Alexa Fluor 568, Molecular probesTM, Eugene, OR, USA). Buňky byly barveny 60 minut ve tmě při pokojové teplotě roztokem phalloidinu (1:200 v 0,2% roztoku Triton X-100 v PBS). Poté byly buňky 2x opláchnuty PBS. Krycí sklíčko bylo vyjmuto a položeno vrchní stranou na podložní sklíčko, kde byla umístěna kapka Mowiolu (Calbiochem, Billerica, MA, USA) s DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Poté byly buňky mikroskopovány pod fluorescenčním mikroskopem Leica Dmi8.

5.15 Diferenciace MSCs

Diferenciace adipocytů byla prováděna po dobu 7 dnů na kultivovaných MSCs za standardních kultivačních podmínek. MSCs byly nasazeny v počtu 2×10^4 buněk na Petriho misky se skleněným dnem (Invitro Scientific, Melbourne, Australia), které jsou určené pro mikroskopování. Ve chvíli, kdy se dosáhlo konfluentní vrstvy buněk, bylo kultivační médium vyměněno za diferenciální. Na přípravu diferenciálního média bylo použito: 10ml 10% DMEM, 10 μ l inzulinu (10 mg/ml, Sigma), 100 μ l indomethacinu (1 M, Sigma), 1 μ l DEX (1 mM, Sigma) a 10 μ l 3-izobutyl-1-methylxanthinu (0,5 M, Sigma). Diferenciální médium bylo měněno každé 2-3 dny. Společně s výměnou diferenciálního média byly k buňkám přidáván NE či CO. Po uplynutí doby potřebné k diferenciaci adipocytů se objevily tukové kapénky. Médium bylo odebráno a buňky byly fixovány 4% paraformaldehydem po dobu 40 minut. Následně byl paraformaldehyd opláchnut PBS a destilované vody. Poté byly buňky barveny pomocí Oil Red O (Sigma) po dobu 50 minut. Barvicí roztok byl připraven přidáním 0,5 g Oil Red O do 100 ml isopropanolu a následně byl roztok isopropanolu naředěn v poměru 3:2 s destilovanou vodou. Po uplynutí doby barvení bylo přebytečné barvivo opláchnuto destilovanou vodou a buňky byly mikroskopovány pod světelným mikroskopem Leica Dmi8.

Diferenciace osteocytů a chondrocytů byla prováděna po dobu 14 dnů MSCs na kultivovaných za standardních podmínek. MSCs byly nasazeny na Petriho misky se skleněným dnem (Invitro Scientific) a po dosažení konfluentní vrstvy buněk bylo kultivační médium vyměněno za diferenciální. Médium pro diferenciaci do osteocytů a chondrocytů bylo připraveno podle protokolu poskytnutého od výrobce v kitu StemPro differentiation kit (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) pro daný buněčný typ. Diferenciální médium bylo měněno každé 2-3 dny. Společně s výměnou diferenciálního média byly k buňkám přidávány NE (10 nM) či CO (0,3 nM). Po uplynutí doby potřebné pro diferenciaci bylo odebráno médium a buňky byly opláchnuty PBS a následně fixovány 20 minut 4% roztokem paraformaldehydu. Poté byl paraformaldehyd opláchnut pomocí deionizované vody a bylo přidáno příslušné barvivo. Chondrocyty byly barveny pomocí Alcian Blue (Sigma, B8438, 1 % in 3 % acetic acid) po dobu 30 minut. Přebytečné barvivo bylo po uplynutí doby barvení odstraněno pomocí 1 nM HCl (hydrochlorid acid, kyselina chlorovodíková) a deionizované vody. Následně byly buňky mikroskopovány pod světelným mikroskopem Leica Dmi8. Osteocyty byly barveny Alizarin Red S (Sigma) po dobu 3 minut. Poté bylo přebytečné barvivo opláchnuto deionizovanou vodou a buňky byly mikroskopovány pod světelným mikroskopem Leica Dmi8.

5.16 Statistická analýza

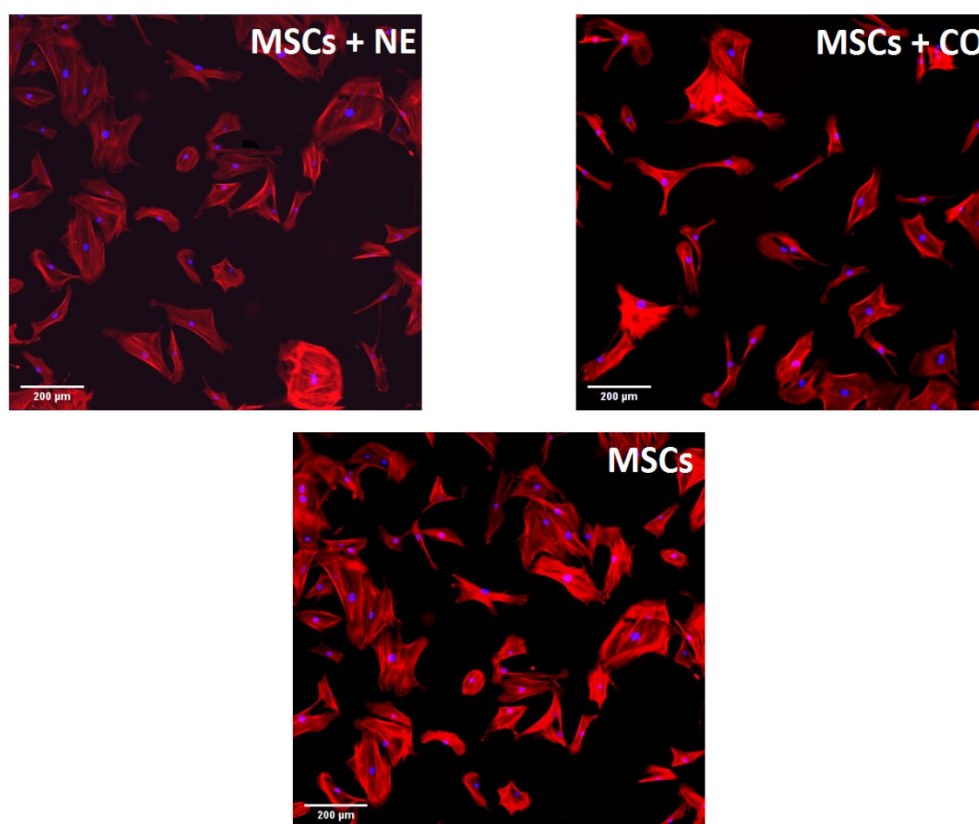
Data byla statisticky vyhodnocena programem GraphPad Prism 8, který zpracoval data pomocí testu ANOVA (Analysis of variance, analýza rozptylu). Hodnoty odchylky $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$ byly považovány za signifikantní.

6. Výsledky

Nejdříve jsem určila, jestli stresové faktory ovlivňují samotné MSCs a jejich vlastnosti. Konkrétně jejich přežívání, morfologii, fenotyp, diferenační schopnosti a metabolickou aktivitu.

6.1 Morfologie MSCs

Přidáním stresových faktorů NE či CO k MSCs do kultivačního média nevedlo ke změně morfologické struktury buněk (obr. 6).

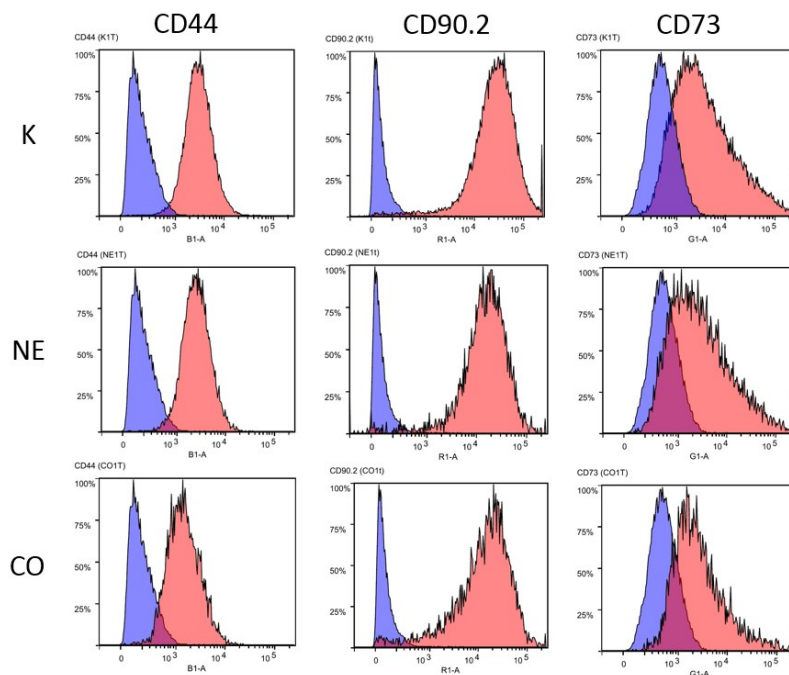


Obrázek 6. Fluorescenční mikroskopie MSCs. Cytoskelet buněk je barven pomocí phalloidinu a jádra pomocí DAPI. Zvětšeno 100x. MSCs – kontrola, nestimulované MSCs, MSCs + NE – MSCs stimulované noradrenalinem, MSCs + CO – MSCs stimulované kortikosteronem.

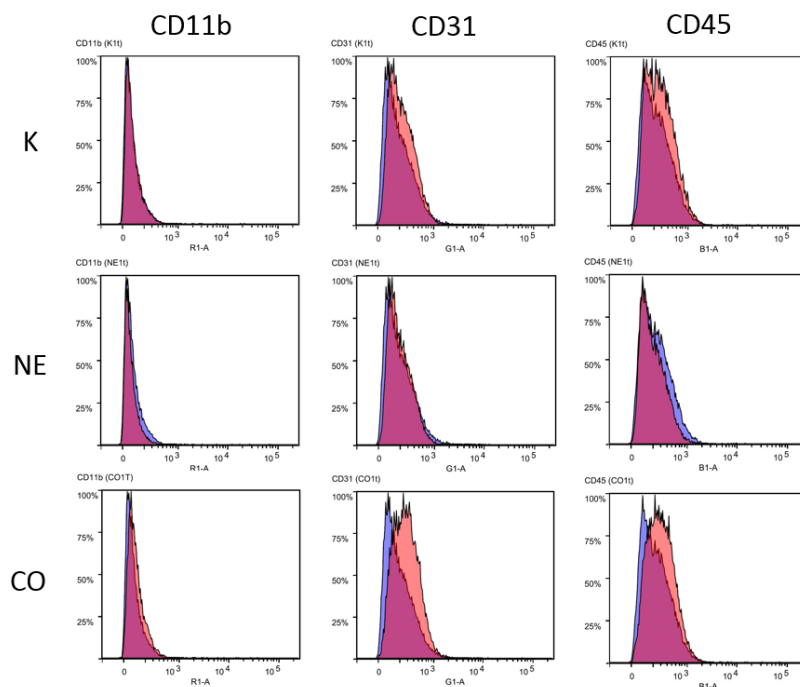
6.2 Fenotyp MSCs

Jedním kritériem, které definuje MSCs, je exprese znaků CD105, CD73, CD44 a CD90 a zároveň absence znaků hematopoetických buněk - CD45, CD31, CD34 či CD11b. Pomocí průtokové cytometrie byla určována přítomnost či absence těchto znaků.

Bylo prokázáno, že ani chronická stimulace MSCs pomocí NE či CO nebyla exprese těchto znaků ovlivněna (obr. 7 a 8).



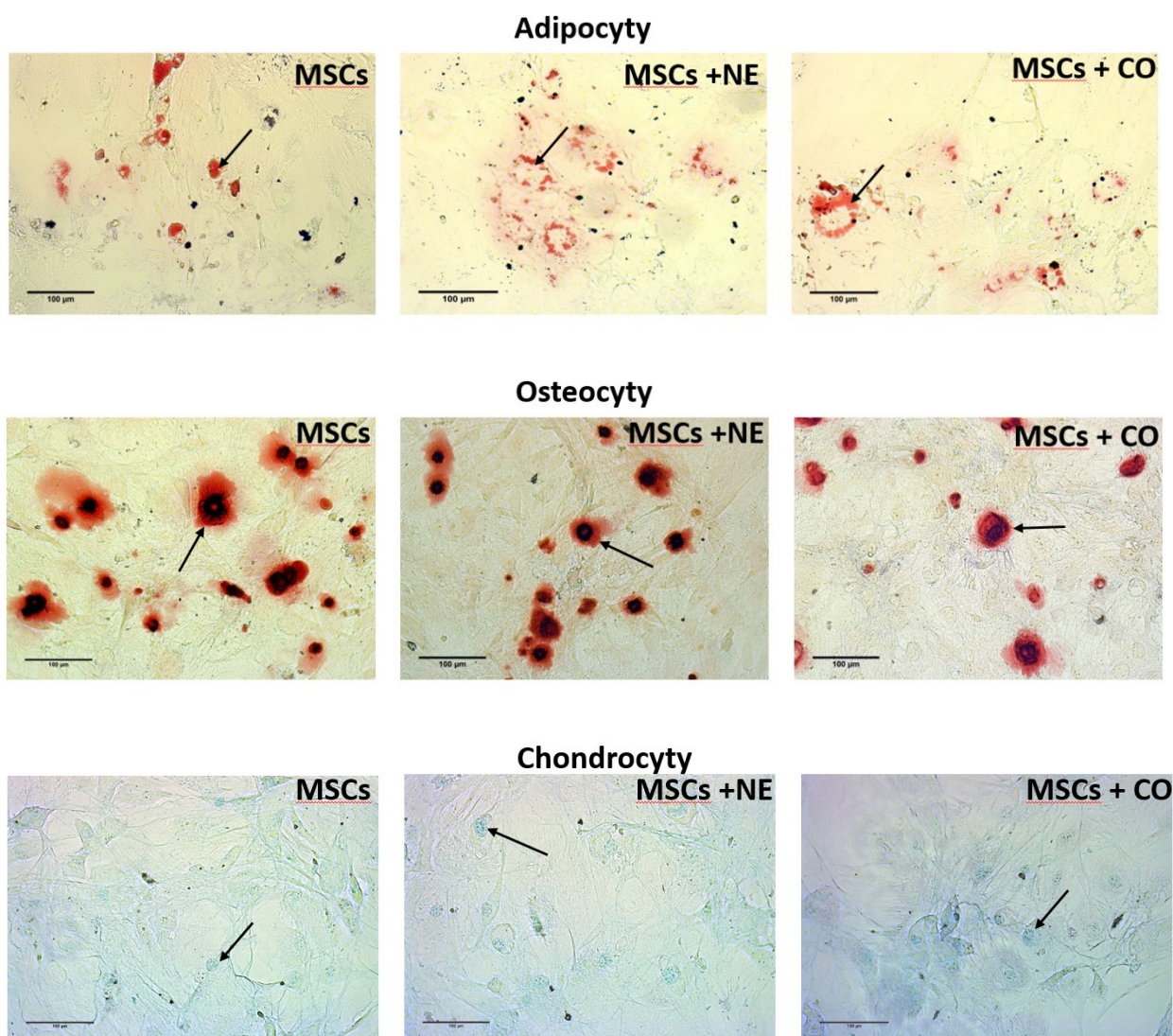
Obrázek 7. Pozitivní markery MSCs. Přítomnost markerů CD44, CD90.2, CD73. Oranžová znázorňuje expresi sledovaného znaku, modrá znázorňuje negativní kontrolu. K- nestimulované MSCs, NE- MSCs stimulované noradrenalinem, CO – MSCs stimulované kortikosteronem.



Obrázek 8. Negativní markery MSCs. Absence markerů CD11b, CD31, CD45. Oranžová znázorňuje expresi sledovaného znaku, modrá znázorňuje negativní kontrolu. K- nestimulované MSCs, NE- MSCs stimulované noradrenalinem, CO – MSCs stimulované kortikosteronem.

6.3 Diferenciace MSCs

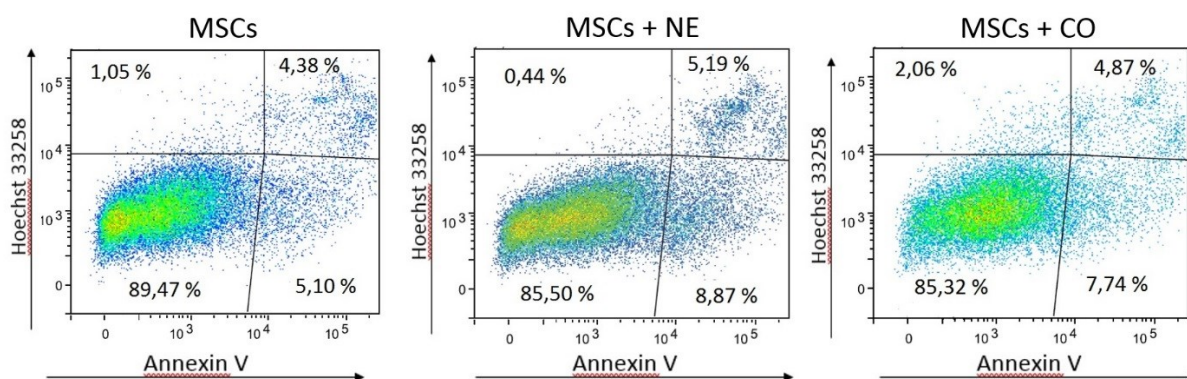
Dalším kritériem, které definuje MSCs, je schopnost buněk se diferenciovat se do tří buněčných typů - adipocytů, chondrocytů a osteocytů. Byla prokázána schopnost diferenciace MSCs do těchto tří buněčných typů. Přidáním NE či CO do diferenciálních medií nebyla ovlivněna jejich schopnost diferenciace (obr. 9).



Obrázek 9. Diferenciace MSCs. Buňky diferenciované v adipocyty, osteocyty a chondrocyty. Adipocyty barveny Red Oil O, osteocyty barveny Alizarin Red S a chondrocyty barveny Alcian Blue. Zvětšeno 200x. MSCs+NE – MSCs stimulované noradrenalinem, MSCs+CO – MSCs stimulované kortikosteronem, MSCs – nestimulované MSCs.

6.4 Přežívání MSCs

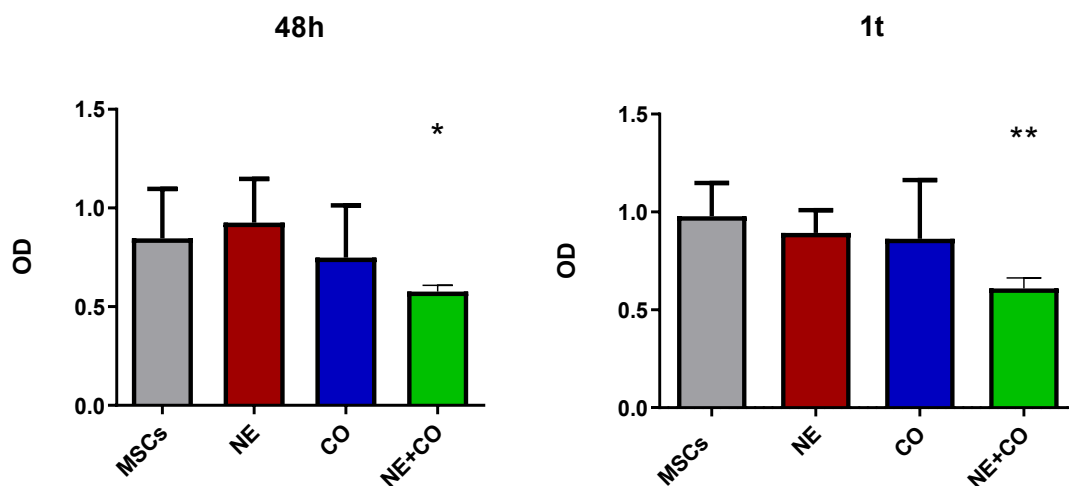
Pomocí průtokové cytometrie bylo zjišťováno přežití MSCs, které byly kultivovány s NE a CO. Počet buněk i procentuální zastoupení živých, apoptotických a mrtvých buněk se výrazně nelišilo u kontrolních a stimulovaných MSCs (obr. 10).



Obrázek 10, Reprezentativní dotploty přežívání MSCs. Procentuální zastoupení apoptotických buněk. MSCs – nestimulované MSCs, MSCs+NE – MSCs stimulované noradrenalinem, MSCs+CO – MSCs stimulované kortikosteronem.

6.5 Metabolická aktivita MSCs

Dále jsem zjišťovala pomocí WST testu, jestli kultivace s NE a CO či jejich kombinace ovlivní metabolickou aktivitu MSCs. Buňky byly krátkodobě kultivovány po dobu 48 hodin a pouze jednou k nim byly přidány stresové faktory. V případě chronické kultivace byly buňky kultivovány 1 týden a každý den k nim byly přidány stresové faktory. Kultivace MSCs v přítomnosti kombinace stresových faktorů potlačila metabolickou aktivitu při krátkodobé i chronické kultivaci (obr. 11).



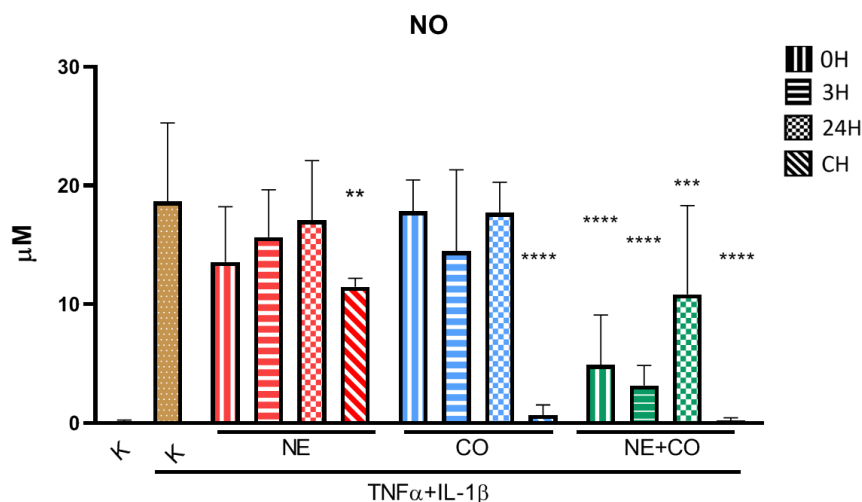
Obrázek 11. Metabolická aktivita MSCs. Měřeno z 5 nezávislých pokusů. MSCs – nestimulované MSCs, NE – buňky stimulované noradrenalinem, CO – buňky stimulované kortikosteronem, NE+CO - buňky stimulované noradrenalinem a kortikosteronem. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Měřeno pomocí spektrofotometru - OD (optická denzita).

6.6 Vliv zánětlivých faktorů na MSCs

Pokud se MSCs dostanou do zánětlivého prostředí, tak jsou aktivovány a začnou produkovat různé faktory, kterými modulují buňky imunitního systému. Proto byl v další fázi studia zjišťován vliv zánětlivých cytokinů $\text{TNF}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ na MSCs. Konkrétně byla studována produkce NO a IL-6, pomocí kterých MSCs modulují imunitní buňky. Buňky byly kultivované v přítomnosti NE, CO či kombinací NE s CO a poté byly stimulované zánětlivými cytokiny $\text{TNF}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$ dle schémat na obr. 3 a 4.

6.6.1 Produkce NO

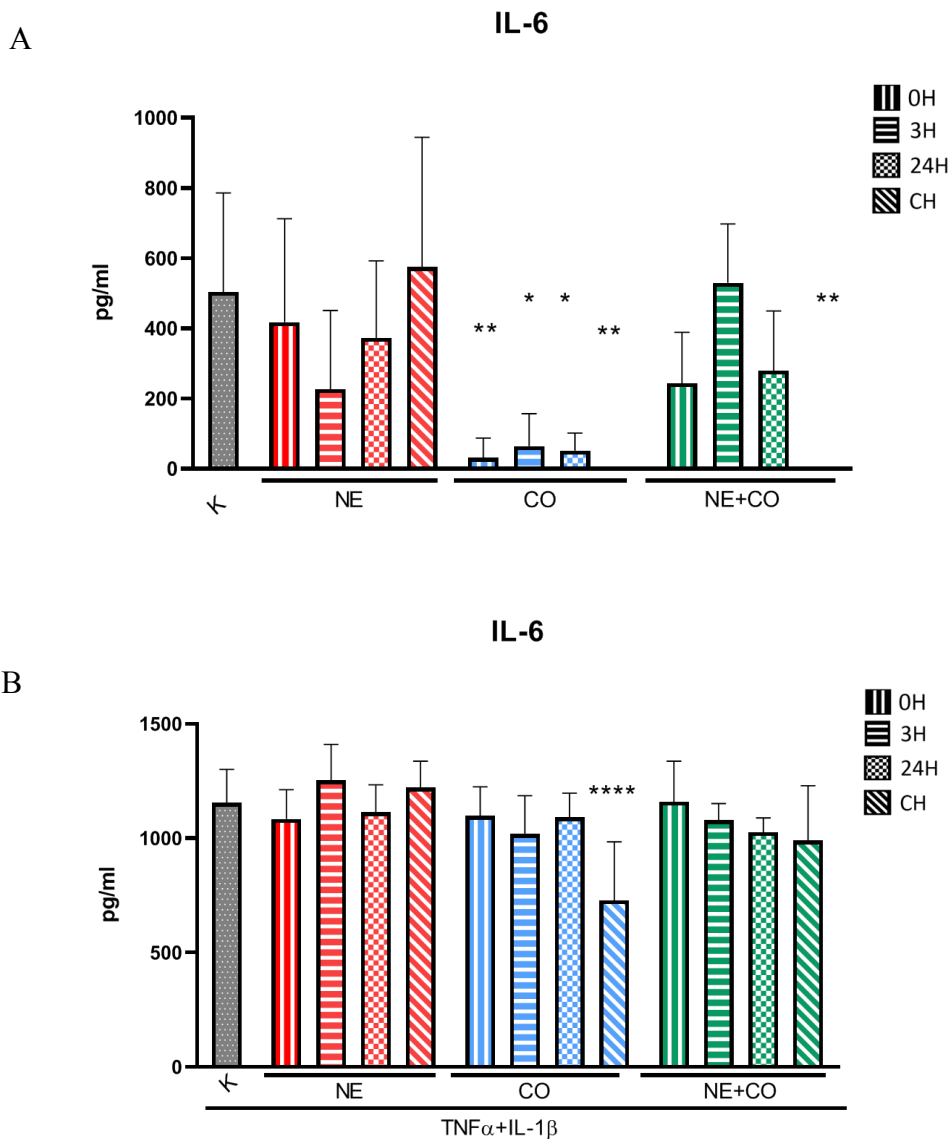
Pomocí Griessovy reakce byla stanovena produkce NO. Produkce NO byla detekována pouze v přítomnosti prozánětlivých cytokinů $\text{TNF}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$. V případě chronické kultivace byla produkce NO snížena v přítomnosti obou stresových faktorů i jejich kombinace. Kultivace v přítomnosti kombinace stresových faktorů snížila produkci NO ve všech skupinách (obr. 12).



Obrázek 12. Produkce oxidu dusnatého. Stanoveno pomocí Griessovy reakce z 5 nezávislých pokusů. K - MSCs nestimulované, NE – MSCs stimulované noradrenalinem, CO – buňky stimulované kortikosteronem, NE+CO - MSCs stimulované noradrenalinem a kortikosteronem. TNF α + IL-1 β – stimulace zánětlivými cytokiny. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ představuje statistickou odchylku vůči K stimulované TNF α + IL-1 β .

6.6.2 Produkce IL-6

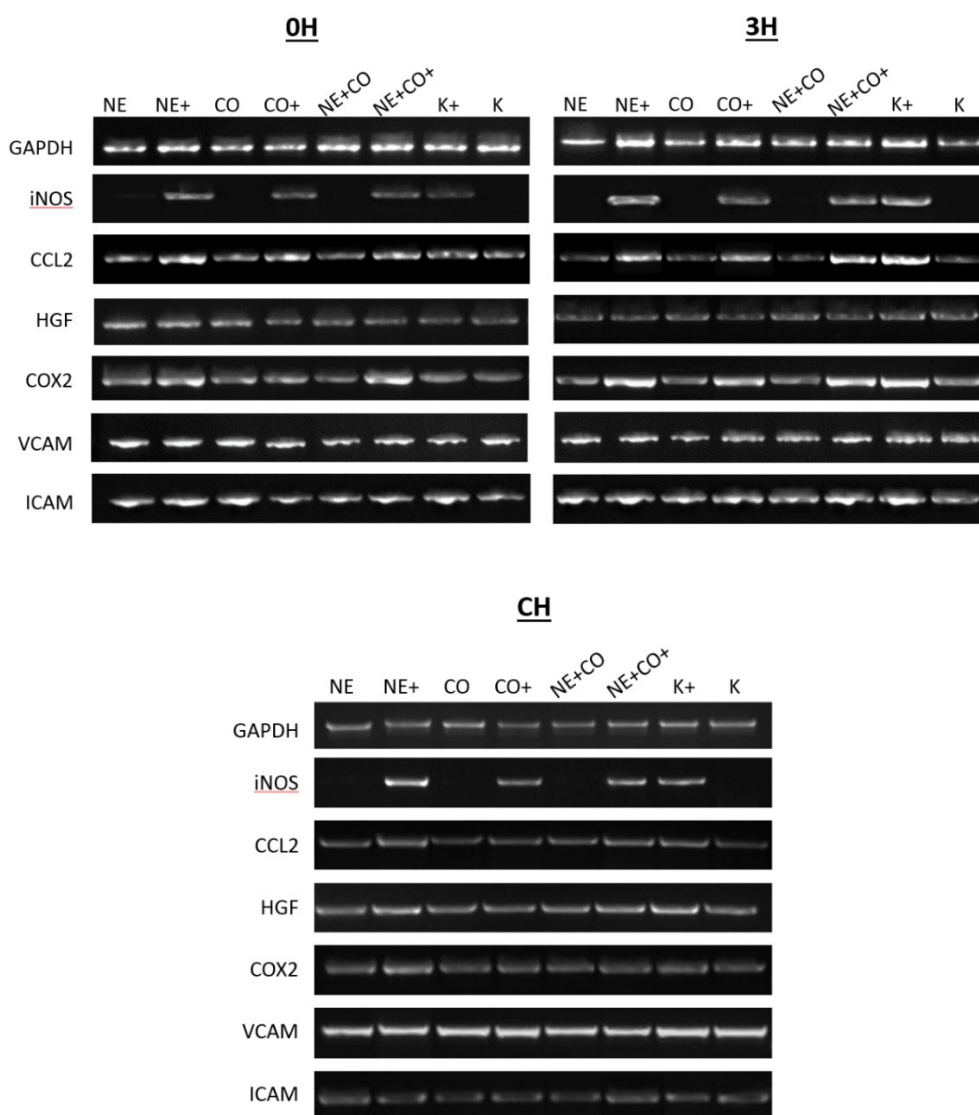
Pomocí ELISA testu byla měřena produkce IL-6 MSCs. Přítomnost CO v kultuře snižovala produkci IL-6 ve všech sledovaných skupinách. Dále bylo pozorováno, že u chronické kultivace MSCs v přítomnosti kombinace stresových faktorů byla produkce IL-6 také snížena. Avšak u MSCs ovlivněných pouze NE nebyla produkce IL-6 snížena (obr. 13A). Pokud byly k MSCs dále přidány zánětlivé cytokiny TNF α a IL-1 β , tak se produkce IL-6 zvýšila a byla v rámci jednotlivých skupin stejná s výjimkou chronické kultivace MSCs s CO, kde byla tato produkce snížena (obr. 13B).



Obrázek 13. Produkce IL-6. Měřeno pomocí ELISA testu z 5 nezávislých pokusů.. **A** – produkce IL-6 bez zánětlivých faktorů, **B** – produkce IL-6 při stimulaci zánětlivými faktory. **K** – MSCs nestimulované stresovými faktory, **NE** – MSCs stimulované noradrenalinem, **CO** – MSCs stimulované kortikosteronem, **NE+CO** – MSCs stimulované noradrenalinem a kortikosteronem. **TNF α + IL-1 β** – stimulace zánětlivými cytokiny. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$ představuje statistickou odchylku vůči K.

6.6.3 PCR

Dále byla zjišťována genová exprese mRNA genů relevantních pro imunomodulační vlastnosti MSCs. Po stimulaci MSCs zánětlivými cytokiny byla indukována exprese genu inducibilní NO syntázy (iNOS, inducible NO synthase) ve všech třech skupinách. TNF α a IL-1 β zvyšovaly expresi genů cyklooxygenázy 2 (COX2, cyclooxygenase 2) COX2 a CCL2 u 3hodinové stimulace MSCs se stresovými faktory. Stimulace MSCs zánětlivými cytokiny a stresovými faktory neměla vliv na expresi genů pro HGF, VCAM a ICAM ve všech skupinách (obr. 14).



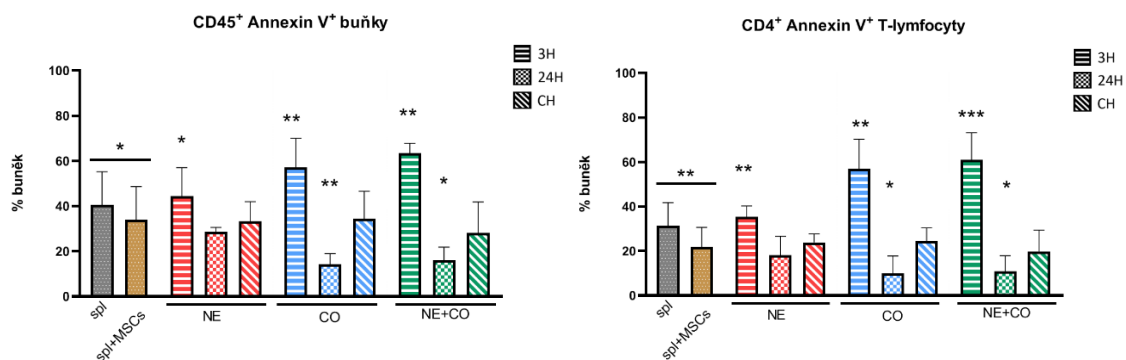
Obrázek 14. *Expese vybraných genů související s imunomodulačními vlastnostmi MSCs. Model akutního stresu – 0H a 3H a model chronického stresu – CH. NE – stimulace noradrenalinem, CO – stimulace kortikosteronem, NE+CO – stimulace kombinací NE a CO, K – kontrola, nestimulované MSCs, + - stimulace TNF α a IL-1 β .*

6.7 Vliv MSCs na lymfocyty

Další fáze studia byla zaměřena na imunomodulační účinky MSCs na aktivované splenocyty. Studovala jsem, zda ovlivnění stresovými faktory mění imunomodulační aktivitu MSCs, kultivovaných NE a CO. Po odmytí stresových faktorů byly MSCs kultivovány v přítomnosti ConA se splenocyty dle schémat na obr. 3 a 4. Kultivace probíhala po dobu 48 hodin či 72 hodin podle sledovaného parametru.

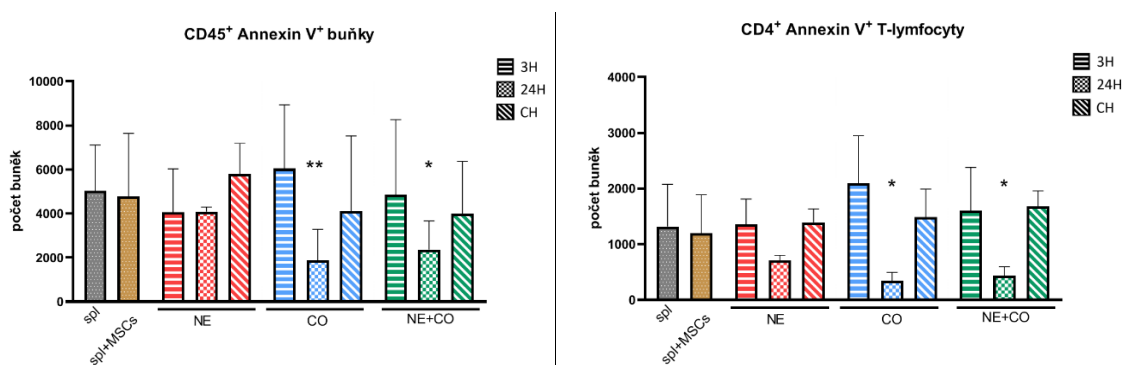
6.7.1 Apoptóza lymfocytů

Nejdříve jsem zjišťovala, zda ovlivnění stresovými faktory moduluje schopnost MSCs potlačit apoptózu splenocytů. Kontrolní nestimulované MSCs potlačovaly apoptózu lymfocytů. Ovšem po kultivaci se stresovými faktory byla schopnost inhibice apoptózy v některých případech potlačena. Po 3hodinové kultivaci s CO či kombinací NE a CO bylo dokonce detekováno zvýšené procentuální zastoupení CD45⁺ Annexin V⁺ i CD4⁺ Annexin V⁺ buněk. Naopak 24hodinová kultivace s CO či kombinací NE a CO podpořila schopnost inhibice apoptózy (obr. 15).



Obrázek 15. Procentuální zastoupení Annexin V⁺ buněk. Měřeno pomocí průtokové cytometrie z 5 nezávislých pokusů. spl – splenocyty, spl+MSCs – splenocyty + MSCs, NE – stimulace MSCs noradrenalinem, CO – stimulace MSCs kortikosteronem, NE+CO – stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,01$ představuje statistickou odchylku vůči spl+MSCs.

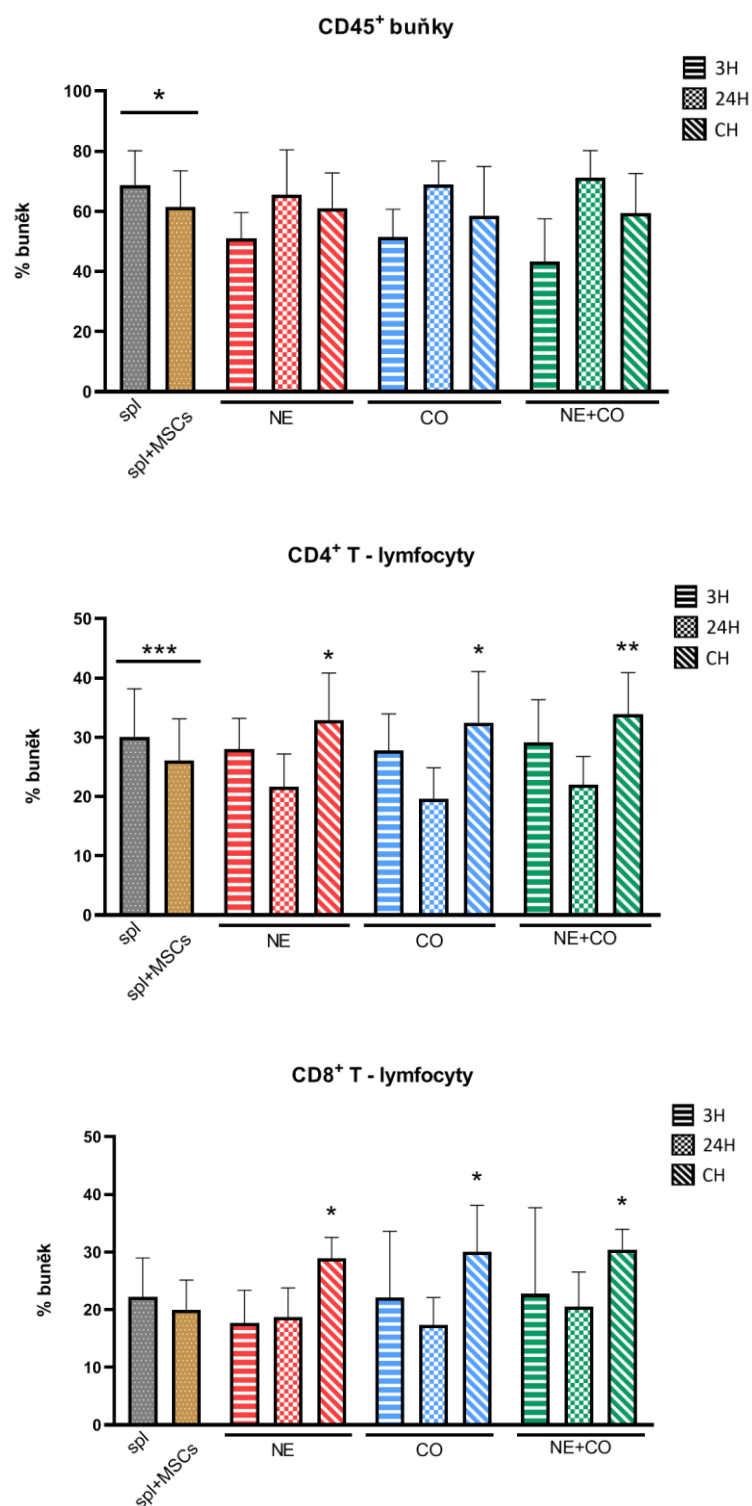
V našich experimentech jsme při měření porovnávali procentuální zastoupení a absolutní počet buněk exprimující daný znak. Můžeme vidět, že trend grafů s procentuálním zastoupením (obr. 15) a absolutním počtem buněk (obr. 16) se shoduje, a proto budou dále prezentovány grafy zobrazující procentuální zastoupení buněk.



Obrázek 16. Absolutní počet Annexin V⁺ buněk. Měřeno pomocí průtokové cytometrie z 5 nezávislých pokusů. spl - splenocyty, samotné splenocyty, spl+MSCs - splenocyty + MSCs, NE – stimulace MSCs noradrenalinem, CO – stimulace MSCs kortikosteronem, NE+CO – stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ představuje statistickou odchylku vůči spl+MSCs.

6.7.2 Vliv na zastoupení populací lymfocytů

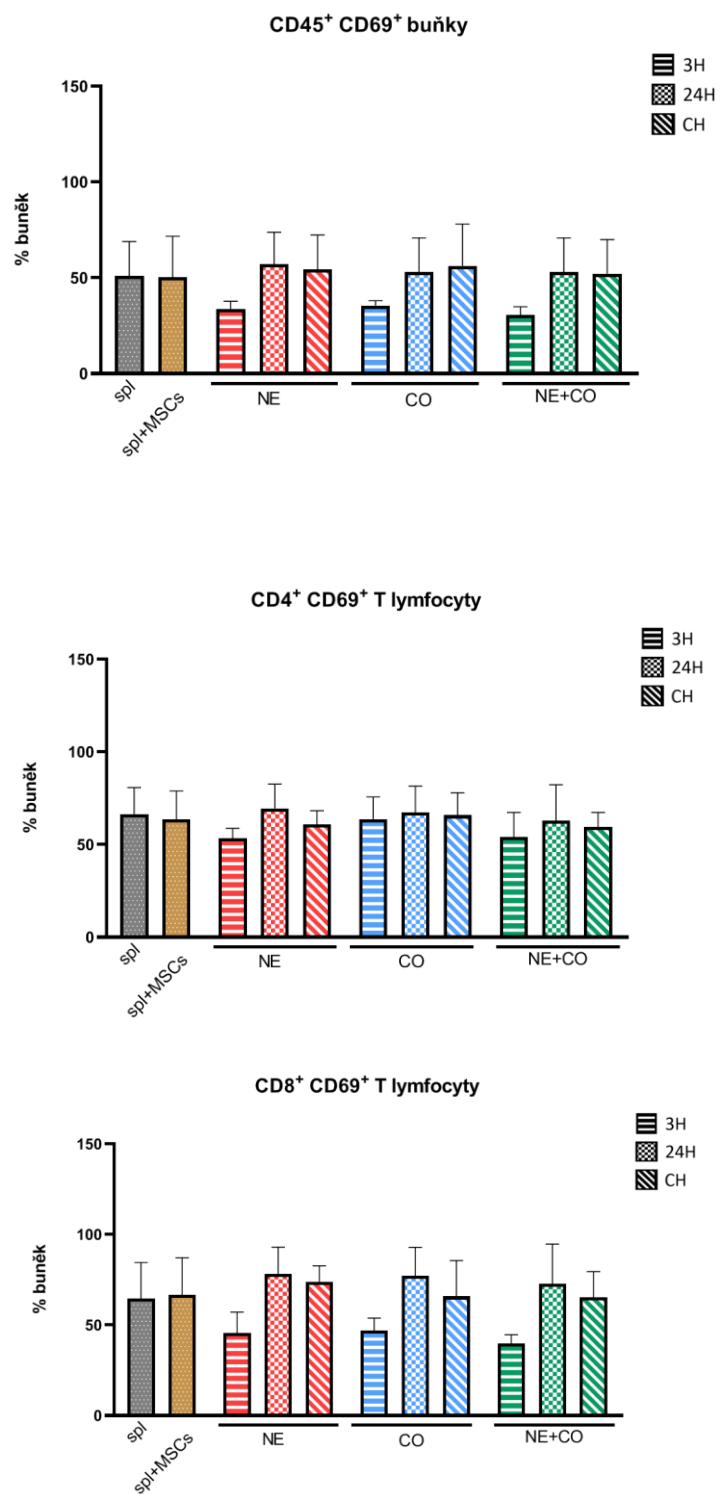
Ovlivněné MSCs byly kultivovány se splenocyty 48 hodin. Poté byla měřena exprese znaků spojených s aktivací a fenotypem splenocytů pomocí průtokové cytometrie. Můžeme vidět, že po kultivaci s nestimulovanými MSCs došlo k signifikantnímu poklesu procenta CD45⁺ buněk a CD4⁺ T lymfocytů a byl pozorován pokles CD8⁺ T lymfocytů. U chronické kultivace MSCs ovlivněných kombinací stresovými faktory byl pozorován signifikantní nárůst CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů oproti kultivaci kontrolních MSCs se splenocyty (obr. 17).



Obrázek 17. Změny v procentuálním zastoupení lymfocytů. Měřeno pomocí průtokové cytometrie z 5 nezávislých pokusů. spl - splenocyty, spl+MSCs - splenocyty + MSCs, NE – stimulace MSCs noradrenalinem, CO – stimulace MSCs kortikosteronem, NE+CO – stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ představuje statistickou odchylku vůči spl+MSCs.

6.7.3 Aktivace lymfocytů

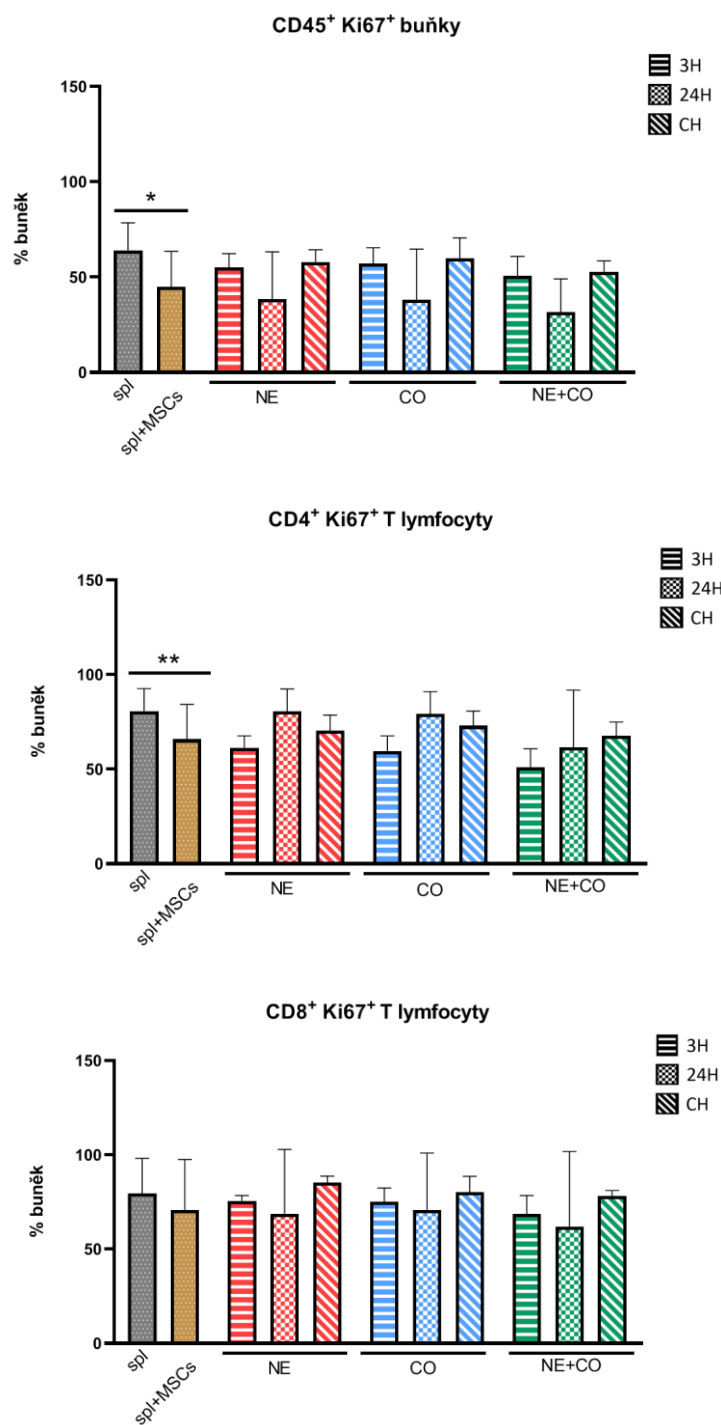
Pomocí průtokové cytometrie byla dále měřena aktivace T lymfocytů po 48 hodinách kultivace. Pozorovaným znakem byl aktivační marker CD69. Můžeme vidět, že kultivace s kontrolními nestimulovanými MSCs neovlivňuje expresi tohoto znaku. Byl pozorovaný nesignifikantní pokles CD45⁺ CD69⁺ buněk, CD4⁺ CD69⁺ a CD8⁺ CD69⁺ T-lymfocytů u 3hodinové kultivace MSCs se stresovými faktory (obr. 18).



Obrázek 18. Aktivace lymfocytů. Měřeno pomocí průtokové cytometrie z 5 nezávislých pokusů. spl - splenocyty, spl+MSCs - splenocyty,+MSCs, NE – stimulace MSCs noradrenalinem, CO – stimulace MSCs kortikosteronem, NE+CO – stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem.

6.7.4 Proliferace lymfocytů

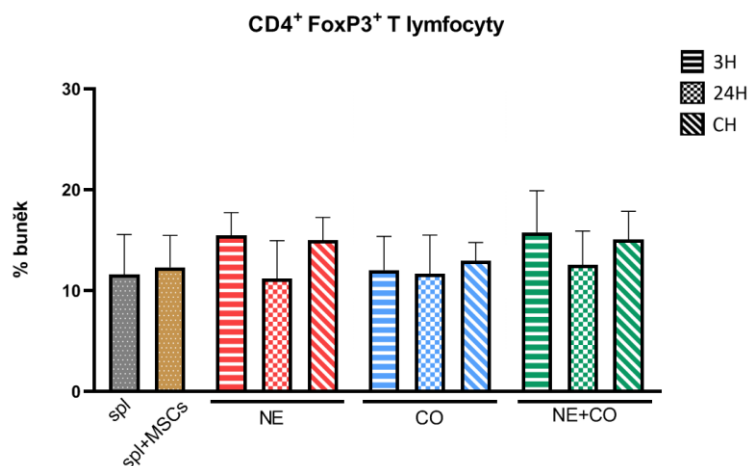
Dalším sledovaným parametrem byla proliferace lymfocytů, která byla měřena po 72 hodinách kultivace s ovlivněnými nebo neovlivněnými MSCs. Pozorovaným znakem byl marker proliferace Ki67. Po kultivaci s nestimulovanými MSCs byla snížena exprese Ki67 u všech sledovaných populací. Stresové faktory tuto schopnost MSCs nijak výrazně neovlivnily (obr. 19).



Obrázek 19. Proliferace lymfocytů. Měřeno pomocí průtokové cytometrie. spl - splenocyty z 5 nezávislých pokusů. spl+MSCs - splenocyty + MSCs, NE – stimulace MSCs noradrenalinem, CO – stimulace MSCs kortikosteronem, NE+CO – stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ představuje statistickou odchylku vůči spl+MSCs.

6.7.5 Populace Treg buněk

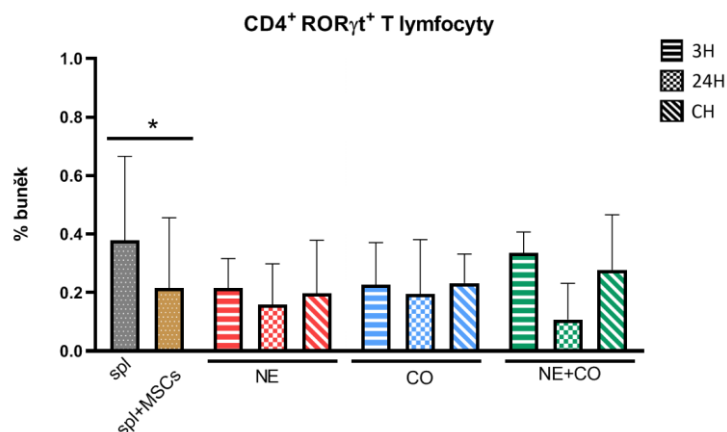
Sledovanou populací byly také Treg buňky, které se podílí na periferní toleranci, definované jako $CD4^+ FoxP3^+$. Po 3hodinové a chronické kultivaci MSCs s NE či kombinací NE a CO došlo u splenocytů k nesignifikantnímu zvýšení $CD4^+ FoxP3^+$ T lymfocytů (obr. 20).



Obrázek 20. Procentuální zastoupení Treg buněk. Měřeno pomocí průtokové cytometrie z 5 nezávislých pokusů. spl - splenocyty, spl+MSCs - splenocyty + MSCs, NE - stimulace MSCs noradrenalinem, CO - stimulace MSCs kortikosteronem, NE+CO - stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem.

6.7.6 Populace Th17 buněk

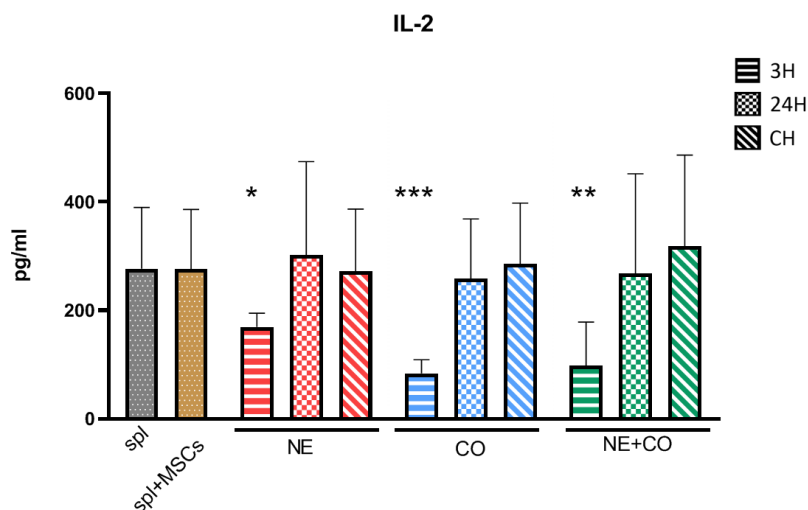
Sledované byly také změny v procentuálním zastoupení Th17 buněk. Po kultivaci s kontrolními nestimulovanými MSCs došlo k signifikantnímu poklesu CD4⁺ RORγt⁺ T lymfocytů. Přítomnost stresových faktorů neměla vliv schopnost MSCs snížit procentuální zastoupení CD4⁺ RORγt⁺ T lymfocytů (obr. 21).



Obrázek 21. Procentuální zastoupení CD4⁺ RORγt⁺ T lymfocytů. Měřeno pomocí průtokové cytometrie z 5 nezávislých pokusů. spl - splenocyty, spl+MSCs- splenocyty + MSCs, NE – stimulace MSCs noradrenalinem, CO – stimulace MSCs kortikosteronem, NE+CO – stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem. * $p \leq 0,05$, představuje statistickou odchylku vůči spl+MSCs.

6.7.7 ELISA test

Prostřednictvím ELISA testu byla změřena IL-2 produkovaného splenocyty po kultivaci s MSCs. Neovlivněné MSCs nezměnily hladinu IL-2 v supernatantu. Významně však byla hladina snížena po 3hodinové kultivaci MSCs se stresovými faktory (obr. 22).



Obrázek 22. Produkce IL-2 splenocyty. Měřeno pomocí ELISA testu z 5 nezávislých pokusů. *spl* - splenocyty, *spl+MSCs* - splenocyty + MSCs, *NE* – stimulace MSCs noradrenalinem, *CO* – stimulace MSCs kortikosteronem, *NE+CO* – stimulace MSCs noradrenalinem a kortikosteronem. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ představuje statistickou odchylku vůči *spl+MSCs*.

7. Diskuse

Vzhledem ke svým vlastnostem a funkcím jsou MSCs studovány v mnoha klinických studiích jako možná podpora léčby řady onemocnění. V průběhu léčby jsou pacienti léčeni v jiném prostředí, než je jejich domov. Dále chronický průběh nemoci nemá dobrý vliv na jejich celkovou psychiku. Pacienti jsou tak ve stresové situaci. Akutní stres organismus nabudí a má pozitivní vliv, a naopak chronický stres organismus vyčerpává a působí negativně také na regeneraci tkání a imunitní systém. Právě MSCs se podílejí na regeneraci a modulaci funkcí buněk imunitního systému. Avšak vliv stresu na MSCs není zcela popsán a existuje jen několik studií, které se zabývaly především změnou diferenciačních vlastností MSCs. Proto cílem této diplomové práce bylo ověřit efekt stresových faktorů NE a CO na vlastnosti a funkce MSCs.

Vybrali jsme NE a CO jako stresové faktory nebo-li mediátory stresu. MSCs byly kultivovány s NE a CO ve fyziologických koncentracích, které jsou zvýšené v průběhu stresu. Morfologická struktura MSCs po kultivaci s NE či CO nebyla změněna. Nejprve jsem sledovala vliv NE a CO na fenotyp MSCs. Jedním z kritérií pro definování MSCs je přítomnost či absence povrchových markerů. Po týdenní kultivaci se stresovými faktory byla na povrchu MSCs prokázána přítomnost znaků CD73, CD44 a CD90.2 typické pro MSCs. Zároveň byla prokázána absence znaků hematopoetických buněk CD45, CD11b a CD31. Dalším kritériem je schopnost diferenciace v adipocyty, chondrocyty a osteocyty. Přítomnost těchto buněčných typů byla ověřena příslušným barvením a nebyla pozorována žádná změna v diferenciaci buněk po dlouhodobé kultivaci. Používané buňky byly ve shodě s minimálními kritérii definující MSCs (Dominici *et al.*, 2006). Existují studie, které uvádí inhibici diferenciace v adipocyty (Li *et al.*, 2010b), osteocyty (Chen and Wang, 2017) a chondrocyty (Jenei-Lanzl *et al.*, 2014) pomocí katecholaminů či agonistů AR. Avšak v mých experimentech nebyl pozorován efekt NE na diferenciační schopnost MSCs. U kultivace s CO taktéž nebyla prokázána zvýšená či snížená schopnost diferenciace v osteocyty, jak uvádí dvě studie, kde se použil GCs s odlišnými koncentracemi (Zhou *et al.*, 2014; Bian *et al.*, 2015). V další studii bylo ukázáno, že GCs podporují diferenciaci adipocytů (Yin, Li and Wang, 2006), ale tento vliv na MSCs po kultivaci s CO také nebyl prokázán. V mé práci nebyly pozorovány žádné změny v diferenciaci MSCs. Důvodem může být odlišná metodika, doba kultivace, použití odlišných stresových faktorů či jejich koncentrace. Dalším důvodem může být fakt, že v ostatních studiích byly používány syntetické GCs, které jsou

více potentní ke GR než GCs přirozeně se vyskytující v organismu. V mojí práci nebyla diferenciaci srovnávána kvantitativně vzhledem k tomu, že tyto změny nebyly primárním cílem této diplomové práce, proto je možné, že některé změny v markerech diferenciaci nebyly detekovány.

Poté bylo ověřeno, jestli není ovlivněna vitalita MSCs při týdenní kultivaci, kdy byly k buňkám přidáván NE či CO. Byla měřena apoptóza MSCs, která se po kultivaci se stresovými faktory procentuálně výrazně nelišila od kontrolních MSCs. Podle jiných studií mohou mít GCs nebo stimulační GR antiapoptotický účinek. Song *et al.* zjistili, že DEX snižuje apoptózu MSCs indukovanou velkou konfluencí buněk (Song, Caplan and Dennis, 2009). Nedávno bylo také ukázáno, že stimulační MR na MSCs zlepšuje přežívání buněk a jejich terapeutický potenciál (Xie *et al.*, 2019). Tento efekt jsem nepozorovala po použití CO. Dále bylo třeba zjistit, zda jsou MSCs metabolicky aktivní po 48hodinové a týdenní kultivaci s NE, CO či jejich kombinací. Kultivace MSCs v přítomnosti kombinace stresových faktorů NE a CO snížila metabolickou aktivitu při krátkodobé i chronické stimulaci. Toto snížení pouze v přítomnosti obou faktorů může být zapříčiněno tím, že buňky byly vystaveny většímu stresovému prostředí. Interakce signalizace katecholaminů a glukokortikoidů není dosud zcela objasněna. Schmidt *et al.* ukázali, že stimulační buněk hipokampu pomocí NE zesiluje GR transaktivaci prostřednictvím β_2 AR. Tento efekt je nejspíše způsoben aktivací fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase) a doprovázela ho zvýšená vazba GR na element reagující GCs. NE tak pravděpodobně zvýšil efekt GCs v buňkách (Schmidt, Holsboer and Spengler, 2001).

MSCs se v zánětlivém prostředí aktivují a začnou produkovat molekuly, pomocí kterých modulují buňky imunitního systému. Proto jsem se v další fázi studie zabývala vlivem zánětlivých cytokinů na funkci MSCs kultivovaných se stresovými faktory. Myší MSCs produkují jako jednu z nejdůležitějších molekul NO, která se uplatňuje v imunosupresivním působení MSCs (Sato *et al.*, 2007). NO bylo detekováno pouze v přítomnosti zánětlivých cytokinů, což bylo v souladu s jinými studiemi (Ren *et al.*, 2008). Při chronické kultivaci byla produkce NO snížena NE a pomocí CO dokonce potlačena. V přítomnosti obou faktorů byla produkce ve všech časech také snížena. Je vidět, že chronické stresové prostředí inhibuje produkci NO MSCs. V případě kultivace MSCs s oběma stresovými faktory byly buňky pravděpodobně opět vystavené většímu stresovému prostředí a mohlo dojít k zesílení transaktivace GR prostřednictvím NE.

Dalším sledovaným významným imunomodulačním cytokinem MSCs byl IL-6. Pomocí IL-6 regulují MSCs polarizaci v Th17 a Treg lymfocyty (Svobodova *et al.*, 2012). Přítomnost CO v kultuře potlačila produkci IL-6 i přes stimulační účinek zánětlivých cytokinů. Tento efekt je v souladu s jinými studiemi. Liao *et al.* použili CO ve fyziologické koncentraci, která je přítomna za stresu. CO snížil u Kupfferových buněk produkci IL-6 indukovanou LPS (Liao *et al.*, 1995). Stejný efekt byl pozorován za použití hydrokortizonu, který snížil produkci IL-6 MSCs i přes stimulační účinek IL-1 β (Liu and Hwang, 2005). V případě potlačení IL-6 po chronické kultivaci s oběma stresovými faktory hrál důležitou roli spíše CO, který jako samotný má velký supresivní účinek na produkci IL-6 a NE mohl jeho účinek podpořit.

Dále byl ověřena exprese mRNA vybraných genů souvisejících s imunomodulačními vlastnostmi MSCs. MSCs dokážou atrahovat buňky imunitního systému například pomocí chemokinu CCL2, který působí jako chemoatraktant monocytů. Poté na buňky působí prostřednictvím faktorů jako jsou například NO a PGE2. Tvorbu PGE2 katalyzuje COX2 a tvorbu NO po aktivaci iNOS. Bylo zjištěno, že při 3hodinové kultivaci se stresovými faktory je exprese COX2 a CCL2 zvýšená v přítomnosti zánětlivých cytokinů, což je v souladu s dalšími studiemi (Yu *et al.*, 2014; Samad *et al.*, 2001). CCL2 společně s CXCR12 zvyšuje expresi IL-10 u makrofágů atrahovaných právě CCL2 (Giri *et al.*, 2020). 3hodinová kultivace se stresovými faktory tedy neměla vliv na produkci PGE2 a polarizaci makrofágů v M2 regulační fenotyp. Exprese iNOS byla zvýšená po stimulaci zánětlivými cytokiny. Stresové faktory tedy neměly vliv na expresi iNOS. Avšak pomocí Griessovy reakce byly změny pozorovány. Existují 3 izoformy NOS, neuronální NOS, endoteliální NOS a iNOS, které se vyskytují i u MSCs (Salvolini *et al.*, 2010). Je tedy možné, že stresové faktory neovlivňují expresi iNOS, ale mohly by snižovat expresi zbývajících dvou NOS. Avšak právě exprese iNOS je závislá na přítomnosti prozánětlivých cytokinů, které byly použity, a je největším producentem NO. Je možné, že ovlivněním stresovými faktory pravděpodobně dochází k postranskripčním modifikacím. Obdobný efekt byl totiž pozorován u produkce NO lidskými hepatocyty, kde miRNA-939 snížila produkci NO, která byla měřena Griessovou reakcí. Dále pomocí Western blotu bylo zjištěno, že miRNA-939 snížila expresi proteinu lidského iNOS, ovšem neměla vliv na expresi mRNA lidské iNOS. Za použití mutagenezní analýzy zjistili, že pro translační represi je nutná vazba miRNA-939 do dvou

míst nepřekládané oblasti 3'UTR (+99 a +112) iNOS. Za použití inhibitoru miRNA-939 nebyla potlačena exprese proteinu ani mRNA iNOS (Guo *et al.*, 2012).

Na buňky imunitního systému působí MSCs také pomocí povrchových molekul jako jsou ICAM a VCAM, díky kterým MSCs přímo interagují s buňkami imunitního systému (Ren *et al.*, 2010) nebo se podílejí na migraci MSCs do místa poškození (Li *et al.*, 2019). Změny v expresi VCAM a ICAM jsem nepozorovala jak v přítomnosti zánětlivých cytokinů, tak stresových faktorů. Po zánětu se MSCs podílejí na regeneraci tkání například prostřednictvím HGF. Nepozorovala jsem vliv stresových faktorů na expresi HGF.

Po ověření vlivu NE a CO na samotné MSCs bylo dále studováno, zda tyto stresové faktory ovlivňují imunomodulační aktivitu MSCs. Pro zjištění této hypotézy jsem kultivovala aktivované splenocyty s ovlivněnými nebo kontrolními MSCs. Nejdříve jsem zjišťovala, jestli stresové faktory mají vliv na schopnost MSCs potlačit apoptózu aktivovaných splenocytů. Kontrolní MSCs tuto schopnost prokázaly, což je v souladu s jinými studiemi. MSCs v kultuře s T-lymfocyty potlačují expresi Fas receptoru a Fas ligandu na T-lymfocytech, které se podílí na indukci apoptózy (Benvenuto *et al.*, 2007). MSCs inhibují apoptózu a podporují přežívání i u jiných typů buněk jako jsou renální tubulární buňky a tím ochránit potkany před akutním poškozením ledvin (Qi and Wu, 2013). Avšak 3hodinová kultivace se stresovými faktory tuto protekční schopnost MSCs potlačila a přežívání lymfocytů se snížilo. Je zajímavé, že chronická kultivace se stresovými faktory neměla žádný vliv.

Poté jsem se zaměřila na to, jestli ovlivnění MSCs pomocí NE a CO má vliv na zastoupení populací lymfocytů. Nestimulované MSCs snížily procentuální zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů, což je v souladu s jinými studiemi (Najar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Zajímavým pozorováním byl efekt stresových faktorů v chronické kultivaci s MSCs. Po ní naopak vzrostlo procentuální zastoupení těchto populací. Jak už bylo řečeno, MSCs jsou schopny působit imunosupresivně například prostřednictvím produkce NO, která v mé práci byla snížena právě u chronické kultivace. Zdá se, že chronické vystavení MSCs stresovým faktorům snížilo supresivní účinek MSCs na CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty.

Kromě zastoupení jednotlivých populací lymfocytů jsem ověřovala aktivaci lymfocytů měřením aktivačního markeru CD69. Ohledně účinku MSCs na aktivaci lymfocytů existují sporné výsledky studií. Jedna uvádí, že po kultivaci lymfocytů s MSCs

se zvýšila exprese CD69 již první den (Saldanha-Araujo *et al.*, 2012). Další studie naopak prokázala, že MSCs mají prostřednictvímIDO supresivní vliv na aktivaci lymfocytů a indukují jim buněčný stres (Laing *et al.*, 2019). V mé práci jsem žádný vliv nestimulovaných MSCs nepozorovala, ale byl detekován nesignifikantní pokles CD45⁺ CD69⁺ buněk, CD4⁺ CD69⁺ a CD8⁺ CD69⁺ T-lymfocytů, které byly v kultuře s MSCs po 3hodinové kultivaci se stresovými faktory. Důvodem toho, že jsem nepozorovala žádný vliv nestimulovaných MSCs, mohlo být jiné použití poměru MSCs:splenocyty či jiná doba kultivace než v jiných studiích. MSCs jsou schopny potlačit proliferaci lymfocytů, proto jsem se dále zaměřila na měření proliferačního markeru Ki67 u lymfocytů. Nestimulované MSCs opravdu snížili procentuální zastoupení Ki67⁺ lymfocytů. Což je v souladu s jinými studiemi, které prokázaly supresivní účinek MSCs (Meisel *et al.*, 2004; Chinnadurai *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2007). MSCs po kultivaci se stresovými přestaly potlačovat proliferaci lymfocytů. Důležitým cytokinem pro aktivaci a proliferaci T-lymfocytů je IL-2. V případě produkce IL-2 jsem pozorovala snížené hladiny u 3hodinové kultivace MSCs se stresovými faktory, která korelovala s pozorovaným poklesem CD44⁺ CD69⁺ buněk, CD4⁺ CD69⁺ a CD4⁺ CD69⁺ T-lymfocytů u 3hodinové kultivace MSCs se stresovými faktory.

Dále jsem sledovala změny v populaci CD4⁺ FoxP3⁺ a CD4⁺ RORγt⁺ T lymfocytů. Nestimulované MSCs neměly vliv na CD4⁺ FoxP3⁺ T-lymfocyty. Ale pozorovala jsem nesignifikantní zvýšení procentuální zastoupení této populace po kultivaci s MSCs, které byly po 3hodinovém a chronickém ovlivnění pomocí NE a kombinací NE a CO. Je možné, že po zopakování více nezávislých pokusů by mohlo být toto zvýšení signifikantní. Studie uvádí, že MSCs podporují vývoj Treg (Ghannam *et al.*, 2010; Svobodova *et al.*, 2012). V případě populace CD4⁺ RORγt⁺ T lymfocytů jsem pozorovala pokles po kultivaci s nestimulovanými MSCs, který byl v souladu s jinými studiemi, a stresové faktory neměly vliv na tuto funkci MSCs (Ghannam *et al.*, 2010; Luz-Crawford *et al.*, 2019)

Hypotézou mé práce bylo, že akutní stres měl podpořit vlastnosti a funkce MSCs a chronický stres měl naopak inhibovat. Avšak výsledky v mé práci jsou nejednoznačné. Akutní model stresu rozhodně nepodporoval funkce MSCs. 3hodinová kultivace inhibovala či neměla vliv na imunosupresivní MSCs. Chronická kultivace MSCs se stresovými faktory také potlačovala imunosupresivní vlastnosti MSCs nebo na tyto vlastnosti neměla žádný vliv. In vitro model byl navrhnut tak, aby simuloval akutní a chronický stres. Akutní stres byl rozdělen do třech skupin – 0H, 3H a 24H, kdy 3hodinová stimulace měla zachytit okno,

ve kterém by buňky mohly být více aktivované. Pro zachycení okna, kdy by stresové prostředí mělo větší vliv na MSCs, by se mohla v budoucnu zkusit jak kratší, tak delší kultivace se stresovými faktory nepřesahující 24 hodin. Je možné, že delší kultivace MSCs se stresovými faktory u chronického modelu stresu by prokázala supresivní účinek na funkce MSCs. Zajímavé by také mohlo být sledování efektu stresových faktorů na migraci MSCs v *in vivo* modelu.

8. Závěr

- Stresové faktory (NE a CO) nemají vliv na morfologii, fenotyp, diferenciační schopnosti a přežívání MSCs.
- V přítomnosti kombinace stresových faktorů je snížena metabolická aktivita MSCs
- V přítomnosti kombinace stresových faktorů je potlačena produkce NO. Zároveň při chronické kultivaci s NE či CO je potlačena produkce NO
- CO potlačuje produkci IL-6
- Chronická kultivace potlačuje supresivní účinek MSCs a zvyšuje procentuální zastoupení CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů
- Stresové faktory neovlivňují supresivní účinek MSCs na aktivaci a proliferaci lymfocytů
- Vliv MSCs na CD4⁺ RORγt⁺ T-lymfocyty není ovlivněn stresovými faktory
- Akutní stres nepodporuje či nemá v našem modelu vliv na funkce a vlastnosti MSCs

Stresové faktory mají vliv na určité funkce a vlastnosti MSCs, avšak tento vliv není zcela jednoznačný. Na základě výsledků v mé diplomové práci je potřeba se podrobněji zaměřit na vztah stresového prostředí a MSCs.

9. Zdroje

- Agac, D., Estrada, L. D., Maples, R., Hooper, L. V. and Farrar, J. D. (2018) 'The beta2-adrenergic receptor controls inflammation by driving rapid IL-10 secretion', *Brain Behav Immun*, 74, pp. 176-185.
- Aggarwal, S. and Pittenger, M. F. (2005) 'Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses', *Blood*, 105(4), pp. 1815-22.
- An, Y., Liu, W. J., Xue, P., Ma, Y., Zhang, L. Q., Zhu, B., Qi, M., Li, L. Y., Zhang, Y. J., Wang, Q. T. and Jin, Y. (2018) 'Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion', *Cell Death Dis*, 9(2), pp. 58.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R. and Pennesi, G. (2005) 'Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway', *European Journal of Immunology*, 35(5), pp. 1482-1490.
- Baharlou, R., Ahmadi-Vasmehjani, A., Faraji, F., Atashzar, M. R., Khoubyari, M., Ahi, S., Erfanian, S. and Navabi, S. S. (2017) 'Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis: Regulatory effects on peripheral blood mononuclear cells activation', *Int Immunopharmacol*, 47, pp. 59-69.
- Beis, D., von Kanel, R., Heimgartner, N., Zuccarella-Hackl, C., Burkle, A., Ehlert, U. and Wirtz, P. H. (2018) 'The Role of Norepinephrine and alpha-Adrenergic Receptors in Acute Stress-Induced Changes in Granulocytes and Monocytes', *Psychosom Med*, 80(7), pp. 649-658.
- Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G. and Uccelli, A. (2007) 'Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state', *Stem Cells*, 25(7), pp. 1753-60.
- Bessout, R., Semont, A., Demarquay, C., Charcosset, A., Benderitter, M. and Mathieu, N. (2014) 'Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation', *Mucosal Immunol*, 7(3), pp. 656-69.
- Bian, Y., Qian, W., Li, H., Zhao, R. C., Shan, W. X. and Weng, X. (2015) 'Pathogenesis of glucocorticoid-induced avascular necrosis: A microarray analysis of gene expression in vitro', *Int J Mol Med*, 36(3), pp. 678-84.
- * Cain, D. W. and Cidlowski, J. A. (2017) 'Immune regulation by glucocorticoids', *Nat Rev Immunol*, 17(4), pp. 233-247.
- Campisi, J. and Fleshner, M. (2003) 'Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats', *J Appl Physiol (1985)*, 94(1), pp. 43-52.
- Carcamo-Orive, I., Gaztelumendi, A., Delgado, J., Tejedos, N., Dorronsoro, A., Fernandez-Rueda, J., Pennington, D. J. and Trigueros, C. (2010) 'Regulation of human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation capacity by glucocorticoid receptor and AP-1 crosstalk', *J Bone Miner Res*, 25(10), pp. 2115-25.

Chen, D. and Wang, Z. (2017) 'Adrenaline inhibits osteogenesis via repressing miR-21 expression', *Cell Biol Int*, 41(1), pp. 8-15.

Chinnadurai, R., Copland, I. B., Patel, S. R. and Galipeau, J. (2014) 'IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells', *J Immunol*, 192(4), pp. 1491-501.

* Ciccarelli, M., Santulli, G., Pascale, V., Trimarco, B. and Iaccarino, G. (2013) 'Adrenergic receptors and metabolism: role in development of cardiovascular disease', *Front Physiol*, 4, pp. 265.

Ciccocioppo, R., Bernardo, M. E., Sgarella, A., Maccario, R., Avanzini, M. A., Ubezio, C., Minelli, A., Alvisi, C., Vanoli, A., Calliada, F., Dionigi, P., Perotti, C., Locatelli, F. and Corazza, G. R. (2011) 'Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease', *Gut*, 60(6), pp. 788-98.

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V. and Uccelli, A. (2006) 'Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions', *Blood*, 107(1), pp. 367-372.

* Cruz-Topete, D. and Cidlowski, J. A. (2015) 'One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids', *Neuroimmunomodulation*, 22(1-2), pp. 20-32.

Dasu, M. R., Ramirez, S. R., La, T. D., Gorouhi, F., Nguyen, C., Lin, B. R., Mashburn, C., Stewart, H., Peavy, T. R., Nolte, J. A. and Isseroff, R. R. (2014) 'Crosstalk between adrenergic and toll-like receptors in human mesenchymal stem cells and keratinocytes: a recipe for impaired wound healing', *Stem Cells Transl Med*, 3(6), pp. 745-59.

Deng, Y. B., Ye, W. B., Hu, Z. Z., Yan, Y., Wang, Y., Takon, B. F., Zhou, G. Q. and Zhou, Y. F. (2010) 'Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats', *Neurol Res*, 32(2), pp. 148-56.

* Dhabhar, F. S. (2008) 'Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection versus Immunopathology', *Allergy Asthma Clin Immunol: Vol. 1*, pp. 2-11.

Dhabhar, F. S. and McEwen, B. S. (1997) 'Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking', *Brain Behav Immun*, 11(4), pp. 286-306.

Dhabhar, F. S. and Viswanathan, K. (2005) 'Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(3), pp. R738-44.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. and Horwitz, E. M. (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315-317.

Engler, H. and Stefanski, V. (2003) 'Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function', *Psychoneuroendocrinology*, 28(8), pp. 951-69.

Franquesa, M., Herrero, E., Torras, J., Ripoll, E., Flaquer, M., Goma, M., Lloberas, N., Anegon, I., Cruzado, J. M., Grinyo, J. M. and Herrero-Fresneda, I. (2012) 'Mesenchymal Stem Cell Therapy Prevents Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in a Rat Kidney Allograft Model', *Stem Cells and Development*, 21(17), pp. 3125-3135.

Frick, L. R., Arcos, M. L., Rapanelli, M., Zappia, M. P., Brocco, M., Mongini, C., Genaro, A. M. and Cremaschi, G. A. (2009) 'Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice', *Stress*, 12(2), pp. 134-43.

Friedenstein, A. J., Piatetzky, S., Il and Petrakova, K. V. (1966) 'Osteogenesis in transplants of bone marrow cells', *J Embryol Exp Morphol*, 16(3), pp. 381-90.

* Gazdic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N. and Stojkovic, M. (2015) 'Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases', *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(2), pp. 280-287.

Ghannam, S., Pène, J., Moquet-Torcy, G., Jorgensen, C. and Yssel, H. (2010) 'Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype', *J Immunol*, 185(1), pp. 302-12.

Giri, J., Das, R., Nylen, E., Chinnadurai, R. and Galipeau, J. (2020) 'CCL2 and CXCL12 Derived from Mesenchymal Stromal Cells Cooperatively Polarize IL-10+ Tissue Macrophages to Mitigate Gut Injury', *Cell Rep*, 30(6), pp. 1923-1934.

* Glaser, R. and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005) 'Stress-induced immune dysfunction: implications for health', *Nat Rev Immunol: Vol. 3*. England, pp. 243-51.

Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W. and Dazzi, F. (2005) 'Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells', *Blood*, 105(7), pp. 2821-7.

Guo, Z., Shao, L., Zheng, L., Du, Q., Li, P., John, B. and Geller, D. A. (2012) 'miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(15), pp. 5826-31.

Hajkova, M., Javorkova, E., Zajicova, A., Trosan, P., Holan, V. and Krulova, M. (2017) 'A local application of mesenchymal stem cells and cyclosporine A attenuates immune response by a switch in macrophage phenotype', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(5), pp. 1456-1465.

* Heming, N., Sivanandamoorthy, S., Meng, P., Bounab, R. and Annane, D. (2018) 'Immune Effects of Corticosteroids in Sepsis', *Front Immunol*, Volume 9, pp. 1736.

Hu, B., Lv, X., Chen, H., Xue, P., Gao, B., Wang, X., Zhen, G., Crane, J. L., Pan, D., Liu, S., Ni, S., Wu, P., Su, W., Liu, X., Ling, Z., Yang, M., Deng, R., Li, Y., Wang, L., Zhang, Y., Wan, M., Shao, Z., Chen, H., Yuan, W. and Cao, X. (2020) 'Sensory nerves regulate mesenchymal stromal cell lineage commitment by tuning sympathetic tones', *The Journal of clinical investigation*. pp. 3483-98

* Huang, P., Chandra, V. and Rastinejad, F. (2010) 'Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics', *Annu Rev Physiol*, 72, pp. 247-72.

- Jenei-Lanzl, Z., Grassel, S., Pongratz, G., Kees, F., Miosge, N., Angele, P. and Straub, R. H. (2014) 'Norepinephrine inhibition of mesenchymal stem cell and chondrogenic progenitor cell chondrogenesis and acceleration of chondrogenic hypertrophy', *Arthritis Rheumatol*, 66(9), pp. 2472-81.
- Brown, J. M., Nemeth, K., Kushnir-Sukhov, N. M., Metcalfe, D. D. and Mezey, E. (2011) 'Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism', *Clinical and Experimental Allergy*, 41(4), pp. 526-534.
- Kappel, M., Poulsen, T. D., Galbo, H. and Pedersen, B. K. (1998) 'Effects of elevated plasma noradrenaline concentration on the immune system in humans', *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 79(1), pp. 93-8.
- Kato, T., Khanh, V. C., Sato, K., Takeuchi, K., Carolina, E., Yamashita, T., Sugaya, H., Yoshioka, T., Mishima, H. and Ohneda, O. (2017) 'SDF-1 improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 493(2), pp. 1010-1017.
- Kim, H. S., Yun, J. W., Shin, T. H., Lee, S. H., Lee, B. C., Yu, K. R., Seo, Y., Lee, S., Kang, T. W., Choi, S. W., Seo, K. W. and Kang, K. S. (2015) 'Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE2 and TGF- β 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation', *Stem Cells*, 33(4), pp. 1254-66.
- Kim, J. and Hematti, P. (2009) 'Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages', *Exp Hematol*, 37(12), pp. 1445-53.
- Kotova, P. D., Sysoeva, V. Y., Rogachevskaja, O. A., Bystrova, M. F., Kolesnikova, A. S., Tyurin-Kuzmin, P. A., Fadeeva, J. I., Tkachuk, V. A. and Kolesnikov, S. S. (2014) 'Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue', *Biochim Biophys Acta*, 1843(9), pp. 1899-908.
- Laing, A. G., Fanelli, G., Ramirez-Valdez, A., Lechler, R. I., Lombardi, G. and Sharpe, P. T. (2019) 'Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress', *PLoS One: Vol. 3*. pp. 1-13.
- Laso-García, F., Ramos-Cejudo, J., Carrillo-Salinas, F. J., Otero-Ortega, L., Feliú, A., Gómez-de Frutos, M., Mecha, M., Díez-Tejedor, E., Guaza, C. and Gutiérrez-Fernández, M. (2018) 'Therapeutic potential of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stem cells in a model of progressive multiple sclerosis', *PLoS One*, 13(9), pp. e0202590.
- Li, C. Y., Chou, T. C., Lee, C. H., Tsai, C. S., Loh, S. H. and Wong, C. S. (2003) 'Adrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes: the role of beta-adrenergic receptors', *Anesth Analg*, 96(2), pp. 518-23.
- Li, G. W., Xu, Z., Chen, Q. W., Chang, S. X., Tian, Y. N. and Fan, J. Z. (2013) 'The temporal characterization of marrow lipids and adipocytes in a rabbit model of glucocorticoid-induced osteoporosis', *Skeletal Radiol*, 42(9), pp. 1235-44.

Li, H., Fong, C., Chen, Y., Cai, G. and Yang, M. (2010a) 'beta2- and beta3-, but not beta1-adrenergic receptors are involved in osteogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA signaling', *Arch Biochem Biophys*, 496(2), pp. 77-83.

Li, H., Fong, C., Chen, Y., Cai, G. and Yang, M. (2010b) 'Beta-adrenergic signals regulate adipogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA pathway', *Mol Cell Endocrinol*, 323(2), pp. 201-7.

Li, M., Sun, X., Kuang, X., Liao, Y., Li, H. and Luo, D. (2014) 'Mesenchymal stem cells suppress CD8+ T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- β ', *Clin Exp Immunol*, 178(3), pp. 516-24.

Li, X., Wang, Q., Ding, L., Wang, Y. X., Zhao, Z. D., Mao, N., Wu, C. T., Wang, H., Zhu, H. and Ning, S. B. (2019) 'Intercellular adhesion molecule-1 enhances the therapeutic effects of MSCs in a dextran sulfate sodium-induced colitis models by promoting MSCs homing to murine colons and spleens', *Stem Cell Res Ther*, 10(1), pp. 267.

Liao, J., Keiser, J. A., Scales, W. E., Kunkel, S. L. and Kluger, M. J. (1995) 'Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver', *Am J Physiol*, 268(3 Pt 2), pp. R699-706.

Liu, C. H. and Hwang, S. M. (2005) 'Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood', *Cytokine*, 32(6), pp. 270-9.

Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P. and Yan, C. (2014) 'Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer', *Microvasc Res*, 92, pp. 10-8.

Luz-Crawford, P., Hernandez, J., Djouad, F., Luque-Campos, N., Caicedo, A., Carrère-Kremer, S., Brondello, J. M., Vignais, M. L., Pène, J. and Jorgensen, C. (2019) 'Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer', *Stem Cell Res Ther*, 10(1), pp. 232.

* Madrigal, M., Rao, K. S. and Riordan, N. H. (2014) 'A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods', *J Transl Med*. pp. 1-14.

* Marik, P. E. and Bellomo, R. (2013) 'Stress hyperglycemia: an essential survival response!', *Crit Care*, 17(2), pp. 305.

* Marino, F. and Cosentino, M. (2013) 'Adrenergic modulation of immune cells: an update', *Amino Acids*, 45(1), pp. 55-71.

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W. and Dilloo, D. (2004) 'Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation', *Blood*, 103(12), pp. 4619-21.

Merino-González, C., Zuñiga, F. A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., Salomón, C. and Aguayo, C. (2016) 'Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application', *Front Physiol*, 7, pp. 1-9.

Mohammadzadeh, A., Pourfathollah, A. A., Shahrokhi, S., Hashemi, S. M., Moradi, S. L. and Soleimani, M. (2014) 'Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets', *Int Immunopharmacol*, 20(2), pp. 316-21.

Monsel, A., Zhu, Y. G., Gennai, S., Hao, Q., Hu, S., Rouby, J. J., Rosenzweig, M., Matthay, M. A. and Lee, J. W. (2015) 'Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cell-derived Microvesicles in Severe Pneumonia in Mice', *Am J Respir Crit Care Med*, 192(3), pp. 324-36.

Najar, M., Fayyad-Kazan, M., Meuleman, N., Bron, D., Fayyad-Kazan, H. and Lagneaux, L. (2018) 'Immunomodulatory effects of foreskin mesenchymal stromal cells on natural killer cells', *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), pp. 5243-5254.

Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H. I., Fayyad Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M. and Lagneaux, L. (2010) 'Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources', *Cell Immunol*, 264(2), pp. 171-9.

Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A. and Mezey, E. (2009) 'Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production', *Nat Med*, 15(1), pp. 42-9.

Nomura, S., Fujitaka, M., Sakura, N. and Ueda, K. (1997) 'Circadian rhythms in plasma cortisone and cortisol and the cortisone/cortisol ratio', *Clin Chim Acta*, 266(2), pp. 83-91.

* Paravati, S. and Warrington, S. J. (2019) 'Physiology, Catecholamines'.

Qi, S. and Wu, D. (2013) 'Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced acute kidney injury in rats by inhibiting cell apoptosis', *Int J Mol Med*, 32(6), pp. 1262-72.

Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L. and Pistoia, V. (2008) 'Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche', *Stem Cells*, 26(1), pp. 151-62.

Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B. and Le Blanc, K. (2003) 'Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells', *Transplantation*, 76(8), pp. 1208-13.

* Reiche, E. M., Nunes, S. O. and Morimoto, H. K. (2004) 'Stress, depression, the immune system, and cancer', *Lancet Oncol*, 5(10), pp. 617-25.

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C. and Shi, Y. (2008) 'Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide', *Cell Stem Cell*, 2(2), pp. 141-50.

Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., Le, A. D., Shi, S., Shao, C. and Shi, Y. (2010) 'Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression', *J Immunol*, 184(5), pp. 2321-8.

Ribeiro, A., Laranjeira, P., Mendes, S., Velada, I., Leite, C., Andrade, P., Santos, F., Henriques, A., Graos, M., Cardoso, C. M., Martinho, A., Pais, M., da Silva, C. L., Cabral, J., Trindade, H. and Paiva, A. (2013) 'Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells', *Stem Cell Res Ther*, 4(5), pp. 125.

Rimando, M. G., Wu, H. H., Liu, Y. A., Lee, C. W., Kuo, S. W., Lo, Y. P., Tseng, K. F., Liu, Y. S. and Lee, O. K. (2016) 'Glucocorticoid receptor and Histone deacetylase 6 mediate the differential effect of dexamethasone during osteogenesis of mesenchymal stromal cells (MSCs)', *Sci Rep*, 6, pp. 37371.

Ryu, C. H., Park, K. Y., Hou, Y., Jeong, C. H., Kim, S. M. and Jeun, S. S. (2013) 'Gene therapy of multiple sclerosis using interferon β -secreting human bone marrow mesenchymal stem cells', *Biomed Res Int*, 2013, pp. 696738.

Saldanha-Araujo, F., Haddad, R., Farias, K. C., Souza Ade, P., Palma, P. V., Araujo, A. G., Orellana, M. D., Voltarelli, J. C., Covas, D. T., Zago, M. A. and Panepucci, R. A. (2012) 'Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF- κ B signalling', *J Cell Mol Med*, 16(6), pp. 1232-44.

Salvolini, E., Lucarini, G., Zizzi, A., Orciani, M., Di Benedetto, G. and Di Primio, R. (2010) 'Human skin-derived mesenchymal stem cells as a source of VEGF and nitric oxide', *Arch Dermatol Res*, 302(5), pp. 367-74.

Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V. and Woolf, C. J. (2001) 'Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity', *Nature*, 410(6827), pp. 471-5.

* Sanders, V. M. and Straub, R. H. (2002) 'Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity', *Brain Behav Immun*, 16(4), pp. 290-332.

Sandi, C., Davies, H. A., Cordero, M. I., Rodriguez, J. J., Popov, V. I. and Stewart, M. G. (2003) 'Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training', *Eur J Neurosci*, 17(11), pp. 2447-56.

Sassoli, C., Pini, A., Chellini, F., Mazzanti, B., Nistri, S., Nosi, D., Saccardi, R., Quercioli, F., Zecchi-Orlandini, S. and Formigli, L. (2012) 'Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF', *PLoS One*, 7(7), pp. e37512.

Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K. and Ozawa, K. (2007) 'Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells', *Blood*, 109(1), pp. 228-34.

Saul, A. N., Oberyszyn, T. M., Daugherty, C., Kusewitt, D., Jones, S., Jewell, S., Malarkey, W. B., Lehman, A., Lemeshow, S. and Dhabhar, F. S. (2005) 'CHRONIC STRESS AND SUSCEPTIBILITY TO SKIN CANCER', *J Natl Cancer Inst*, 97(23), pp. 1760-7.

Schmidt, P., Holsboer, F. and Spengler, D. (2001) 'Beta(2)-adrenergic receptors potentiate glucocorticoid receptor transactivation via G protein beta gamma-subunits and the phosphoinositide 3-kinase pathway', *Mol Endocrinol*, 15(4), pp. 553-64.

Shipunova, N. N., Petinati, N. A. and Drize, N. I. (2013) 'Effect of hydrocortisone on multipotent human mesenchymal stromal cells', *Bull Exp Biol Med*, 155(1), pp. 159-63.

* Smith, S. M. and Vale, W. W. (2006) 'The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress', *Dialogues Clin Neurosci*, 8(4), pp. 383-95.

Song, I. H., Caplan, A. I. and Dennis, J. E. (2009) 'Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells', *J Orthop Res*, 27(2), pp. 216-21.

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

Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C. and Moretta, L. (2008) 'Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2', *Blood*, 111(3), pp. 1327-33.

* Spees, J. L., Lee, R. H. and Gregory, C. A. (2016) 'Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function', *Stem Cell Res Ther*, 7(1), pp. 125.

Stefanski, V. and Engler, H. (1998) 'Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats', *Physiol Behav*, 64(5), pp. 733-41.

Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P. and Holan, V. (2012) 'The Role of Mouse Mesenchymal Stem Cells in Differentiation of Naive T-Cells into Anti-Inflammatory Regulatory T-Cell or Proinflammatory Helper T-Cell 17 Population', *Stem Cells and Development*, 21(6), pp. 901-910.

Takahashi, H. K., Morichika, T., Iwagaki, H., Yoshino, T., Tamura, R., Saito, S., Mori, S., Akagi, T., Tanaka, N. and Nishibori, M. (2003) 'Effect of beta 2-adrenergic receptor stimulation on interleukin-18-induced intercellular adhesion molecule-1 expression and cytokine production', *J Pharmacol Exp Ther*, 304(2), pp. 634-42.

Takarada, T., Hojo, H., Iemata, M., Sahara, K., Kodama, A., Nakamura, N., Hinoi, E. and Yoneda, Y. (2009) 'Interference by adrenaline with chondrogenic differentiation through suppression of gene transactivation mediated by Sox9 family members', *Bone*, 45(3), pp. 568-78.

Tang, Y. L., Zhao, Q., Qin, X., Shen, L., Cheng, L., Ge, J. and Phillips, M. I. (2005) 'Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction', *Ann Thorac Surg*, 80(1), pp. 229-36; discussion 236-7.

* Timmermans, S., Souffriau, J. and Libert, C. (2019) 'A General Introduction to Glucocorticoid Biology', *Front Immunol*, 10.

Torres, K. C., Antonelli, L. R., Souza, A. L., Teixeira, M. M., Dutra, W. O. and Gollob, K. J. (2005) 'Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC', *J Neuroimmunol*, 166(1-2), pp. 144-57.

Tyurin-Kuzmin, P. A., Chechekhin, V. I., Ivanova, A. M., Dyikanov, D. T., Sysoeva, V. Y., Kalinina, N. I. and Tkachuk, V. A. (2018a) 'Noradrenaline Sensitivity Is Severely Impaired in Immortalized Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Line', *Int J Mol Sci: Vol. 12*.

Tyurin-Kuzmin, P. A., Dyikanov, D. T., Fadeeva, J. I., Sysoeva, V. Y. and Kalinina, N. I. (2018b) 'Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells', *Sci Data*, 5, pp. 180196.

Tyurin-Kuzmin, P. A., Fadeeva, J. I., Kanareikina, M. A., Kalinina, N. I., Sysoeva, V. Y., Dyikanov, D. T., Stambolsky, D. V. and Tkachuk, V. A. (2016) 'Activation of β -adrenergic receptors is required for elevated α 1A-adrenoreceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells', *Sci Rep*.

* Ullah, I., Subbarao, R. B. and Rho, G. J. (2015) 'Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective', *Bioscience Reports*, 35, pp. 18.

* van der Velden, V. H. (1998) 'Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma', *Mediators Inflamm*, 7(4), pp. 229-37.

Varga, G., Ehrchen, J., Brockhausen, A., Weinhage, T., Nippe, N., Belz, M., Tsianakas, A., Ross, M., Bettenworth, D., Spieker, T., Wolf, M., Lippe, R., Tenbrock, K., Leenen, P. J., Roth, J. and Sunderkotter, C. (2014) 'Immune suppression via glucocorticoid-stimulated monocytes: a novel mechanism to cope with inflammation', *J Immunol*, 193(3), pp. 1090-9.

Viswanathan, K. and Dhabhar, F. S. (2005) 'Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(16), pp. 5808-13.

* Wang, M., Yuan, Q. and Xie, L. (2018) 'Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application', *Stem Cells Int*, 2018, pp. 3057624.

Wu, B., Wang, L., Yang, X., Mao, M., Ye, C., Liu, P., Yang, Z., Lei, D. and Zhang, C. (2016) 'Norepinephrine inhibits mesenchymal stem cell chemotaxis migration by increasing stromal cell-derived factor-1 secretion by vascular endothelial cells via NE/abrd3/JNK pathway', *Exp Cell Res*, 349(2), pp. 214-220.

Wu, W., Yamaura, T., Murakami, K., Murata, J., Matsumoto, K., Watanabe, H. and Saiki, I. (2000) 'Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice', *Life Sci*, 66(19), pp. 1827-38.

Xie, X., Shen, Y., Chen, J., Huang, Z. and Ge, J. (2019) 'Mineralocorticoid receptor deficiency improves the therapeutic effects of mesenchymal stem cells for myocardial infarction via enhanced cell survival', *J Cell Mol Med: Vol. 2*, pp. 1246-56.

Yang, X., Han, Z. P., Zhang, S. S., Zhu, P. X., Hao, C., Fan, T. T., Yang, Y., Li, L., Shi, Y. F. and Wei, L. X. (2014) 'Chronic restraint stress decreases the repair potential from mesenchymal stem cells on liver injury by inhibiting TGF-beta1 generation', *Cell Death Dis*, 5, pp. e1308.

* Yaribeygi, H., Panahi, Y., Sahraei, H., Johnston, T. P. and Sahebkar, A. (2017) 'The impact of stress on body function: A review', *Excli j*, 16, pp. 1057-1072.

Yin, L., Li, Y. B. and Wang, Y. S. (2006) 'Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis', *Chin Med J (Engl)*, 119(7), pp. 581-8.

Yu, K. R., Lee, J. Y., Kim, H. S., Hong, I. S., Choi, S. W., Seo, Y., Kang, I., Kim, J. J., Lee, B. C., Lee, S., Kurtz, A., Seo, K. W. and Kang, K. S. (2014) 'A p38 MAPK-mediated alteration of COX-2/PGE2 regulates immunomodulatory properties in human mesenchymal stem cell aging', *PLoS One*, 9(8), pp. e102426.

* Yuan, X., Logan, T. M. and Ma, T. (2019) 'Metabolism in Human Mesenchymal Stromal Cells: A Missing Link Between hMSC Biomanufacturing and Therapy?', *Front Immunol*, Vol. 10. pp. 1-11.

Zhang, S., Lv, C., Yang, X., Han, Z., Zhang, J., Zong, C., Gao, L., Li, L., Zhao, Q., Li, R., Yang, Y., Yu, F., Li, X., Zhang, P. and Wei, L. (2015) 'Corticosterone mediates the inhibitory effect of restraint stress on the migration of mesenchymal stem cell to carbon tetrachloride-induced fibrotic liver by downregulating CXCR4/7 expression', *Stem Cells Dev*, 24(5), pp. 587-96.

Zhao, Z. G., Xu, W., Sun, L., You, Y., Li, F., Li, Q. B. and Zou, P. (2012) 'Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells', *Immunol Invest*, 41(2), pp. 183-98.

Zhou, D. A., Zheng, H. X., Wang, C. W., Shi, D. and Li, J. J. (2014) 'Influence of glucocorticoids on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells', *BMC Musculoskelet Disord*, 15, pp. 239.

* Sekundární citace