

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Palacká

Možnosti využití kmenových buněk pro léčbu diabetické retinopatie
Potential of stem cell therapy for diabetic retinopathy

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Vladimír Holáň, DrSc.

Praha 2018

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc. za poskytnuté rady a věnovaný čas. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Barboře Heřmánkové a Mgr. Janu Kösslovi za ochotu a připomínky, které přispěly ke vzniku této bakalářské práce.

Obsah	
Seznam zkratk	5
Abstrakt	7
Abstract	8
Úvod	9
1. Diabetes mellitus	10
2. Diabetická retinopatie	10
3. Současná léčba diabetické retinopatie	13
4. Kmenové buňky	14
4.1 Embryonální kmenové buňky	14
4.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky	14
4.3 Kmenové buňky z dospělého organismu	14
4.4 Mesenchymální kmenové buňky	15
4.5 Mesenchymální kmenové buňky z kostní dřeně a tukové tkáně	16
5. Experimentální modely	17
5.1 Příklady <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> diferenciaci MSC v nervové buňky a buňky sítnice	17
5.2 Migrace a integrace MSC do sítnice.....	19
5.3 Regulace produkce neurotrofních faktorů a proangiogenních faktorů pomocí MSC.....	20
5.4 Vliv MSC na potlačení fibrovaskulárních jizev	21
5.5 Vliv MSC na regulaci zánětu.....	21
5.6 Využití MSC k regulaci hladiny glukózy a úrovně ROS	22
5.7 Účinek MSC na stabilitu BRB.....	23
5.8 Vliv MSC na apoptózu buněk.....	23
5.9 Působení MSC na celkové zlepšení vidění jedinců s DR	24
5.10 Podobnost mezi pericyty a MSC	24
5.11 Příklady použití iPSC a ESC pro léčbu DR	25
6. Příklady klinických studií	25
6.1 Příklady probíhajících klinických studií využití kmenových buněk k léčbě poškození sítnice	25
6.2 Příklady ukončených klinických studií využití kmenových buněk k léčbě poškození sítnice	26
7. Závěr	27
8. Použitá literatura	29

Seznam zkratk

AD-MSC, adipose-derived mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně

anti-HuNu, anti-human nuclei antibody

BDNF, brain-derived neurotrophic factor, mozkový neurotrofický faktor

bFGF, basic fibroblast growth factor, bazický fibroblastový růstový faktor

BM-MSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně

BRB, blood retinal barrier, hematoretinální bariéra

CD, cluster of differentiation, diferenciační antigen

CRABP1, cellular retinoic acid-binding protein 1

CRBB2, crystallin beta B2

DM, diabetes mellitus

DR, diabetic retinopathy, diabetická retinopatie

EDN2, endothelin 2 precursor

EGF, epidermal growth factor, epidermální růstový faktor

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

ERG, elektroretinografie

ESC, embryonal stem cell, embryonální kmenové buňky

GAT3, GABA transporter type 3

GBP2, guanylate binding protein 2

GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor, neurotrofický faktor z gliální linie

GFAP, glial fibrillary acidic protein, gliový fibrilární kyselý protein

GFP, green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein

HIF-1 α , hypoxia-inductible factor-1 α

HGF, hepatocyte growth factor, růstový faktor pro hepatocyty

HSC, hematopoietic stem cell, hematopoetické kmenové buňky

ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1, mezibuněčná adhezivní molekula-1

IDO, indolamine 2,3-dioxygenase

IFN- γ , interferon- γ

iNOS, inducible nitric oxide synthase, indukovatelná syntáza oxidu dusnatého

IL, interleukin

iPSC, induced pluripotent stem cell, indukované pluripotentní kmenové buňky

LAMA5, lamin subunit alpha-5 gene

MAP2, microtubule-associated protein 2

MHC, major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

MSC, mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky

NCSC, neural crest-derived stem cell, kmenové buňky neurální lišty

NeuN, neuronal nuclear protein

NGF, nerve growth factor, nervový růstový faktor

NK, natural killer, přirození zabijáci

NO, oxid dusnatý

NPDR, nonproliferative diabetic retinopathy, neproliferativní DR

PCR, polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

qPCR, quantitative polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce

PDGF, platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor

PDR, proliferative diabetic retinopathy, proliferativní DR

PKC, proteinkináza C

ROS, reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

RP, retinitis pigmentosa

SSC, spermatogonial stem cell, spermatogenní kmenové buňky

TGF- β , transforming growth factor- β , transformující růstový faktor- β

Th1, T helper cell 1, pomocné T buňky 1

TIMP 1, TIMP metalloproteinase inhibitor 1

TNF- α , tumor necrosis factor- α , faktor nekrotizující nádory α

TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, metoda detekce apoptických DNA fragmentů

UMSC, umbilical cord mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky z pupečnickové krve

VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1, cévní adhezivní molekuly

VEGF, vascular endothelial growth factor, vaskulární endotelový růstový faktor

Abstrakt

Diabetická retinopatie je onemocnění sítnice způsobující nevratné poškození buněk a tím i postupnou ztrátu zraku. Současná léčba je velice omezená a spojená s četnými vedlejšími účinky. Nadějnou možností léčby degenerativních onemocnění sítnice je použití kmenových buněk. Existují různé typy kmenových buněk. Patří mezi ně embryonální kmenové buňky, indukované pluripotentní kmenové buňky a buňky z dospělého organismu, mezi které můžeme zařadit mesenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells). MSC jsou buňky nacházející se téměř ve všech tkáních dospělého organismu. Mohou migrovat do místa poškození, regulovat v sítnici průběh zánětu, potlačit vznik fibrovaskulárních jizev a nahradit poškozené buňky, jako jsou například nervové buňky, fotoreceptory a epiteliální pigmentové buňky. Aplikace MSC by tak mohla být slibnou léčbou pro degenerativní onemocnění sítnice.

Klíčová slova: diabetická retinopatie, kmenové buňky, buněčná terapie

Abstract

Diabetic retinopathy is retinal disease causing irreversible cell damage and consequently a loss of vision. Current treatment protocols have many limitations and are associated with serious site effects. A possible treatment options for retinal degenerative diseases is a use of stem cells. There are different types of stem cells. These include embryonal stem cells, induced pluripotent stem cells and cells from an adult organism, among which we can include mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs can be found in almost all tissues of the adult organism. MSCs can migrate to the site of damage, regulate development of inflammation in retina, suppress the formation of fibrovascular scars and replace damaged cells such as nerve cells, photoreceptors and epithelial pigment cells. Application of MSCs could be a promising treatment for degenerative retinal diseases.

Key words: diabetic retinopathy, stem cells, cell therapy

Úvod

Diabetická retinopatie (DR, diabetic retinopathy) patří mezi doprovodná onemocnění diabetu a v současné době se řadí mezi nejčastější příčiny poškození a následné ztráty zraku. Dochází při ní k narušení buněk sítnice, poškození hematoretinální bariéry, vzniku fibrovaskulárních jizev a dalším faktorům snižujícím schopnost vidění. Nynější léčba dokáže pouze zpomalit rozvoj onemocnění, její účinnost je navíc značně omezená a většinou spojená s dalšími komplikacemi. Jednou z perspektivních možností léčby tohoto onemocnění je buněčná terapie využívající kmenové buňky.

Kmenové buňky jsou už několik let studovány pro svou schopnost diferenciaci v různé buněčné typy a jejich imunomodulační vlastnosti. Můžeme je rozdělit na embryonální kmenové buňky (ESC, embryonal stem cell), indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC, induced pluripotent stem cell) a kmenové buňky z dospělého organismu. Mezi kmenové buňky z dospělého organismu můžeme zařadit například mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cell), které se nacházejí téměř ve všech tkáních. V současné době jsou MSC často využívány díky svým schopnostem produkovat celou řadu trofických a růstových faktorů, imunomodulačních molekul a cytokinů. Mohou navíc putovat do místa poškození a nahradit degenerované nebo chybějící buněčné typy. Tyto vlastnosti jsou využívány v buněčné terapii. Aplikace kmenových buněk by tak mohla být slibnou léčbou poškození sítnice při DR. MSC mohou nahradit poškozené buňky jako jsou například nervové buňky, fotoreceptory a pericyty a regulovat další faktory způsobující zhoršení kvality zraku.

1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) patří mezi nejčastější metabolická onemocnění. Toto onemocnění můžeme rozdělit na dva základní typy. DM 1. typu je způsoben postupným zánikem beta buněk Langerhansových ostrůvků. Jedná se o chronické autoimunitní onemocnění s multifaktoriálním projevem. Současná léčba zahrnuje dlouhodobé podávání inzulínu pomocí inzulínových pump nebo injekcí. Nejedná se však o celkové vyléčení onemocnění, ale pouze o udržení správné hladiny glukózy v krvi (Preeti and Brayman, 2013). DM 2. typu je běžnější forma onemocnění, kdy dochází k nedostatečnému působení inzulínu. U pacientů s tímto typem onemocnění hrají důležitou roli rizikových faktorů genetické predispozice, životní styl a jejich vzájemná interakce. Onemocnění je také často spojeno s dalšími komplikacemi jako je diabetická neuropatie, kardiovaskulární problémy a DR (Wu et al., 2014). DR se může vyskytovat u obou typů DM, ale rozvoj podobného onemocnění je možný i u pacientů, kterým DM nebyl diagnostikován (Venkatramani and Mitchell, 2004).

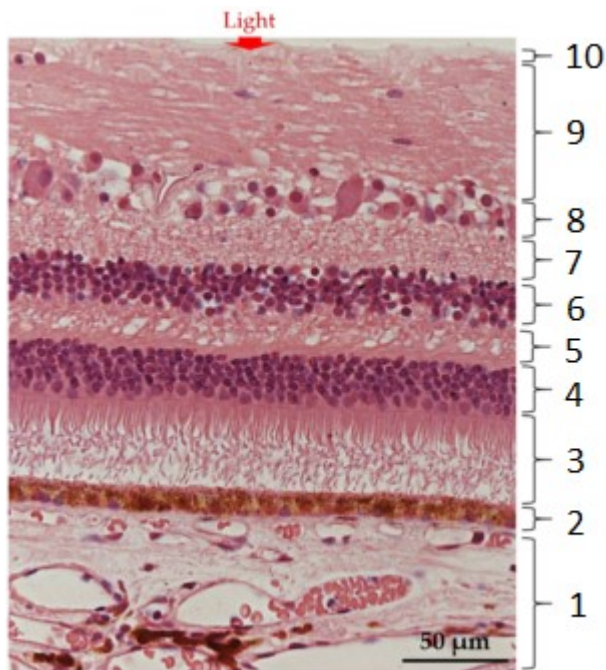
2. Diabetická retinopatie

Sítnice slouží ke snímání a předzpracování světelných signálů. Je složená z několika rozdílných buněčných vrstev, které si signály předávají a vzájemně spolu komunikují (Obr.1). První vrstvou jsou epiteliální pigmentové buňky, následuje vrstva tyčinek a čípků, poté zevní jádrová vrstva, zevní plexiformní vrstva, vnitřní vrstva jádrová, vnitřní plexiformní vrstva, vrstva gangliových buněk, vrstva nervových vláken, a nakonec vnitřní ohraničující membrána (Alonso-Alonso and Srivastava, 2015). Poškození kterékoliv z těchto vrstev vede u pacientů s DM k rozvoji DR.

V současné době patří DR k hlavním příčinám poškození a ztráty zraku. Průběh tohoto onemocnění můžeme rozdělit do dvou stádií. Prvním stádiem je neproliferativní DR (NPDR, nonproliferative diabetic retinopathy), kdy nedochází v sítnici k neovaskularizaci. NPDR je charakterizována především vznikem mikroaneurysma a krvácením sítnice. Druhé stádium je proliferativní DR (PDR, proliferative diabetic retinopathy), při které dochází k tvorbě nových kapilár. NPDR většinou předchází PDR (Mbata et al., 2017).

Důsledky DR mohou být závažné změny ve vnímání barevného kontrastu a adaptaci na tmu a změny v elektroretinografii. Tyto symptomy se mohou vyskytnout již před klinickými projevy DR a jejich příčinou je dysfunkce neuronů v sítnici zapříčiněná přímým působením hyperglykémie nebo oxidativním poškozením (Park, 2016).

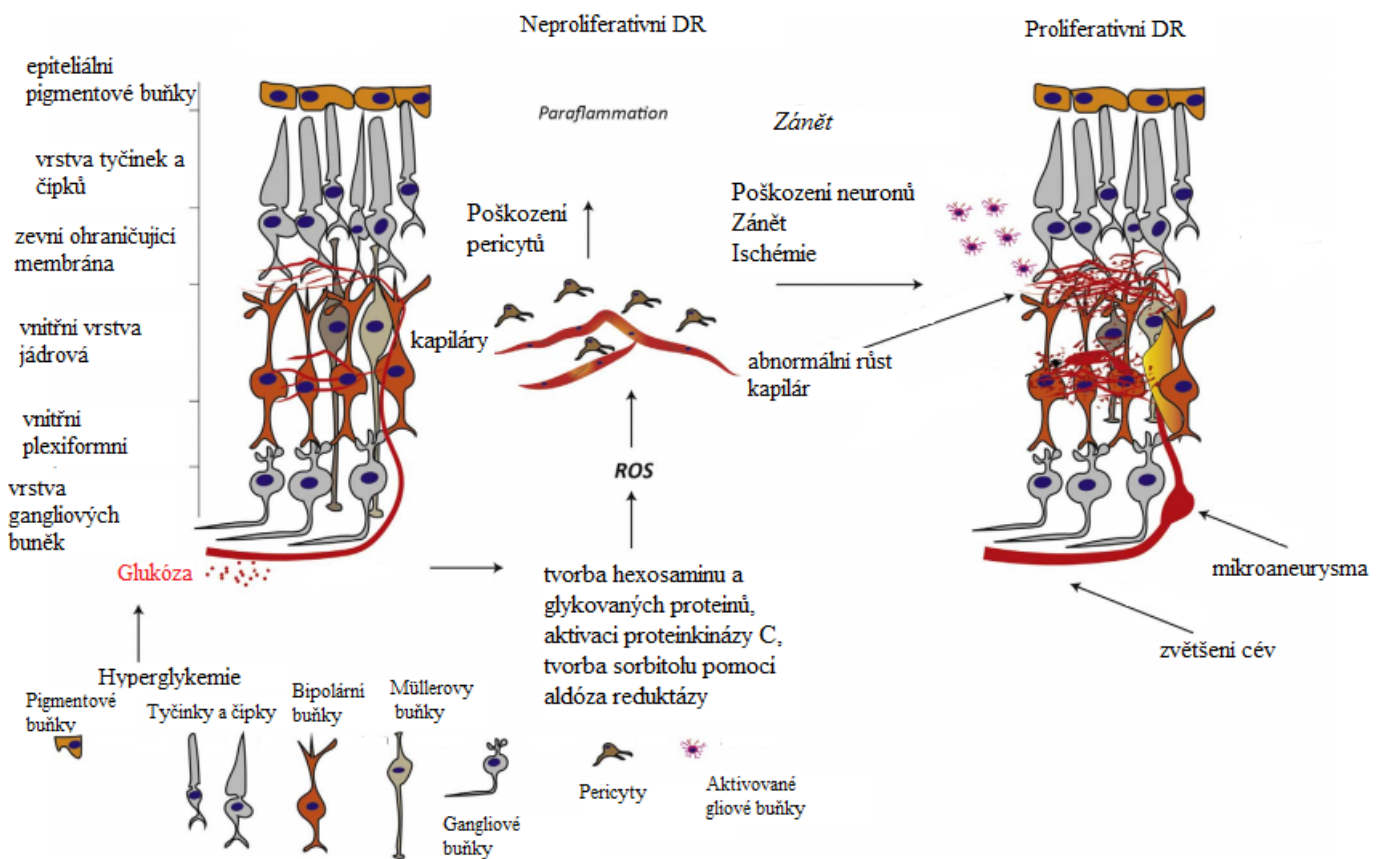
Sítnice je jednou z nejméně metabolicky aktivních tkání, a proto vyžaduje vlastní krevní zásobování. Pericyty obklopující krevní kapiláry regulují průtok krve, stabilizují endotelové buňky a zabezpečují ochranu před hypoxií a zahájením angiogeneze. Při DR dochází v počáteční fázi k zeslabování stěn cév a k úbytku pericytů, jejichž snížení je jednou z hlavních příčin rozvoje tohoto onemocnění. Ztráta pericytů způsobuje špatné prokrvení, omezení přísunu kyslíku a živin, tvorbu makulárního edému a patologickou angiogenezi, což následně vede k hypoxii až ischemii. Existuje několik mechanismů ztráty pericytů. Při DM dochází ke kumulaci špatně syntetizovaných proteinů v endoplazmatickém retikulu a pomocí autofagie pak dochází k lysozomálnímu rozkladu proteinů. Studium mechanismů autofagie proto může být využito v terapii DR (Fu et al., 2016). Dalším způsobem ztráty pericytů může být apoptóza způsobena zvýšenou aktivitou kaspázy-8 a kaspázy-3 (Feenstra et al., 2013).



Obrázek 1: Základní struktura sítnice. Zdola: cévnatka (1), epiteliální pigmentové buňky (2), vrstva tyčinek a čípků (3), zevní jádrová membrána (4), zevní plexiformní vrstva (5), vnitřní vrstva jádrová (6), vnitřní plexiformní vrstva (7), vrstva gangliových buněk (8), vrstva nervových vláken (9), vnitřní ohraničující membrána (10). (převzato a upraveno z Ding et al., 2017)

Hyperglykemie a následná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) jsou jednou z nejvýznamnějších příčin poškození sítnice u DR. K produkci ROS dochází především v elektrotransportním řetězci mitochondrií, díky špatnému metabolismu zapříčiněnému hyperglykemickými stavy (Ali et al., 2008). Stoupající koncentrace ROS poškozuje lipidy, proteiny a následně i DNA buněk, což může vést až k jejich apoptóze. V sítnici jsou náchylné především gangliové a gliové buňky, u kterých dochází oxidativním

poškozením k programované buněčné smrti (Martin et al., 2004). Dalším možným zdrojem ROS může být endoplazmatické retikulum při přenosu elektronů a při špatném sbalení proteinů nebo v důsledku vyčerpání glutathionu. Zvýšená hladina ROS také může vést přes dráhu poly (ADP-riboza) polymerázy a snížení aktivity glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázy k tvorbě hexosaminu a glykovaných proteinů, které napomáhají indukci oxidativního stresu. Vysoká koncentrace ROS dále vede k aktivaci proteinkinázy C (PKC), která je schopná způsobit například snížení endoteliální syntázy oxidu dusnatého vedoucí k vasodilataci, a naopak zvýšení vazokonstričního faktoru endothelin-1. Zvýšení koncentrace glukózy přispívá také k tvorbě sorbitolu pomocí aldóza-reduktázy. Tím dochází ke spotřebě nikotinamidadeninukleotidfosfátu, který je potřebný pro regeneraci buněčných antioxidantů. Touto cestou pak dochází v buňkách k větší náchylnosti poškození oxidativním stresem (Obr. 2) (Brownlee, 2005; Masuda et al., 2017).



Obrázek 2: Průběh DR. Během NPDR dochází především ke ztrátě pericytů a vzniku mikroaneurysmat. Při PDR dochází k tvorbě nových kapilár. (převzato a upraveno z Fiori et al., 2018)

Vysoká koncentrace reaktivních forem kyslíku stimuluje a aktivuje HIF-1a (hypoxia-inductible factor-1 alpha), který indukuje expresi vaskulárního endotelového růstového faktoru

(VEGF, vascular endothelial growth factor). Chronická produkce VEGF zvyšuje permeabilitu cév a angiogenesi, což následně přispívá k rozvoji DR a tvorbě fibrovaskulárních jizev (Megaw and Dhillon, 2014). Zvýšená produkce ROS v důsledku hyperglykémie ovlivňuje endotelové a zároveň i nervové buňky sítnice. Vede také k produkci dalších růstových faktorů, jako je například nervový růstový faktor (NGF, nerve growth factor), mozkový neurotrofický faktor (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) a neurotrofický faktor z gliální linie (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor) (Ezquer et al., 2016).

Hemoretinální bariéra (BRB, blood retinal barrier) zajišťuje v sítnici homeostázi a tím také pomáhá udržovat její imunologickou privilegovanost. BRB je složená ze dvou vrstev těsných spojů (tight junction) a její propustnost může být ovlivňována například oxidativním stresem, VEGF nebo zánětem (Minhas et al., 2016). Zánět u DR se projevuje na mikroskopické úrovni a je charakterizován zvýšenou produkcí faktoru nekrotizujícího nádory α (TNF- α , tumor necrosis factor- α), VEGF a navýšenou expresí mezibuněčné adhezivní molekuly-1 (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1), cévní adhezivní molekuly (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1) a dalších molekul. Tyto faktory dále zvyšují přilnavost leukocytů a makrofágů ke kapilárám, což může vést k cévní dysfunkci a tím ke zhroucení BRB, předčasné buněčné smrti a ischemii (Das, 2016). Tyto a další faktory zhoršují poruchy vidění, což může vést následně až k oslepnutí.

3. Současná léčba diabetické retinopatie

Současná léčba DR zahrnuje regulaci krevního tlaku, hladiny glukosy a lipidů, laserovou fotokoagulaci a vitrektomii. Farmakologická léčba je založena na potlačení biochemických mechanismů spojených s rozvojem DR, jako je oxidativní stres, angiogeneze a aktivace PKC (Das, 2016). Další možností se ukázalo použití protilátek anti-VEGF, které mohou selektivně zablokovat VEGF a tak zmírnit rozvoj neovaskularizace. Použití inhibitorů VEGF však nemá dlouhodobou účinnost a může být doprovázeno dalšími nepříznivými projevy (Salam et al., 2011). Z chirurgických metod je v pokročilém stádiu DR využívána laserová fotokoagulace. Tato metoda je při včasnému použití účinná pro zpomalení ztráty zraku a zrakové ostrosti. Souvisí však s komplikacemi, kdy může docházet k poškození tkáně sítnice, redukcii zorného pole, zhoršení zraku a akutnímu glaukomu (Ezquer et al., 2014). Vitrektomie se provádí při zakrvácení sklivce a tento zákrok je často doprovázen různými komplikacemi, jako je šedý zákal nebo neovaskularizace duhovky. Úspěšnost je také závislá na závažnosti onemocnění. Většina používaných metod je invazivní a vhodná především pro pacienty v

počátečních stádiích onemocnění. Slibnou léčbou DR a obecně poškození sítnice se jeví použití kmenových buněk, které by mohly nahradit chybějící buňky, podpořit regeneraci tkáně a potlačit zánětlivou reakci v místě poškození.

4. Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou přítomné ve většině tkání a zahrnují rozdílné buněčné populace, které jsou charakteristické schopnostmi neustálé sebeobnovy a zároveň diferenciaci na jiné buněčné typy. Z jedné kmenové buňky vzniká dělením nová kmenová buňka a zároveň buňka dceřiná, která se dále diferenciuje. Populace kmenových buněk se za normálních okolností dělí pomalu, při poškození však vlivem signálu dochází k jejich rychlému dělení a diferenciaci. Kmenové buňky se dále vyznačují svojí sníženou imunogenicitou, která je způsobena nízkou expresí či absencí molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, major histocompatibility complex) a absencí exprese kostimulačních molekul. Díky tomu také nevyvolávají proliferaci alogenních lymfocytů v tkáňové kultuře. Kmenové buňky můžeme rozdělit na ESC, iPSC a kmenové buňky z dospělého organismu (Mahla, 2016).

4.1. Embryonální kmenové buňky

ESC jsou pluripotentní a snadno se diferencují na jakýkoliv buněčný typ dospělého jedince. Získávají se z blastocysty zárodku. Problém však představuje jejich častý nekontrolovatelný růst a možnost tvorby teratomů v organismu. Jejich použití je také značně omezeno etickými problémy spojenými s jejich získáváním (Gong et al., 2014; Kanji and Das, 2017).

4.2. Indukované pluripotentní kmenové buňky

iPSC jsou připravovány *in vitro* ze somatických buněk dospělého organismu, do kterých jsou vneseny geny pro 4 transkripční faktory Oct4, Sox2, Klf4 a cMyc (Takahashi and Yamanaka, 2006). Jejich výhodou je možnost autologní transplantace a také eliminace etických problémů, které se vyskytují u ESC. Jejich nevýhodou je však použití virových vektorů při jejich přípravě a možnost tvorby teratomů (Zomer et al., 2015).

4.3. Kmenové buňky z dospělého organismu

Kmenové buňky z dospělého organismu se nacházejí prakticky ve všech tkáních. Existence těchto buněk byla prokázána v mnoha orgánech, jako je kostní dřev, mozek, kůže,

svaly, srdce, krev a další. Jejich funkcí je pravděpodobně zachování homeostáze a tkáňová regenerace. Mezi kmenové buňky s terapeutickým potenciálem můžeme zařadit hematopoetické kmenové buňky (HSC, hematopoetic stem cell), které zajišťují tvorbu erythroidní, lymfoidní a myeloidní buněčné linie. Jsou využívány při léčbě řady hematologických a imunologických onemocnění. Jejich zdrojem při transplantacích jsou kostní dřeň, pupečnicková a periferní krev. Jiným typem kmenových buněk z dospělého organismu jsou například kmenové buňky neurální lišty (NCSC, neural crest-derived stem cell). Jsou to buňky původně se nacházející během vývoje na dorsálním okraji neurálního valu. V pozdějších stádiích je schopnost dělení NCSC omezena, přesto je stále možné nalézt tyto buňky v dospělých tkáních, jako jsou tkáň periferního nervového systému, ganglia dorzálního kořene a střeva. Dále zde můžeme zařadit spermatogenní kmenové buňky (SSC, spermatogonial stem cell), které jsou zárodečnou linií spermatogeneze. Jedná se o unipotentní buňky neustále produkující diferencované dceřiné buňky (Ng and Yung, 2015). Dalším typem kmenových buněk z dospělého organismu jsou MSC, které jsou často využívány v různých studiích.

4.4 Mesenchymální kmenové buňky

MSC můžeme nalézt v celé řadě tkání jako je například kostní dřeň, tuková tkáň, pupečnicková krev a další (Ding and Shyu, 2011). Pro charakterizaci MSC byla stanovena Mezinárodní společností pro buněčnou terapii základní kritéria. Jedním z nich je exprese diferenciačních antigenů (CD, cluster of differentiation) CD73, CD90, CD105 a naopak absence hematopoetických znaků CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α a molekul MHC 2. třídy. Dále musí za standardních kultivačních podmínek vykazovat adhezenci k plastovému povrchu a *in vitro* se diferencovat na adipocyty, chondroblasty a osteoblasty (Dominici et al., 2006).

Pro buněčnou terapii je důležitá diferenciace MSC v rozdílné buněčné typy. Kromě adipocytů, chondroblastů a osteoblastů se mohou diferencovat v různých podmínkách na nervové buňky, svalové buňky, tukové buňky a mnohé další (Ding and Shyu, 2011).

MSC mají imunomodulační vlastnosti, díky kterým mohou regulovat imunitní odpověď. Produkují celou řadu imunomodulačních molekul, jako je například oxid dusnatý (NO) (Sato et al., 2007), cyklooxygenáza-1 a cyklooxygenáza-2 zajišťující tvorbu prostaglandinů (Ryan et al., 2007), hem-oxygenáza-1 (Chabannes et al., 2007), transformující růstový faktor- β (TGF- β , transforming growth factor β), prostaglandin E2 (English et al., 2009) a růstový faktor pro hepatocyty (HGF, hepatocyte growth factor) (Neuss et al., 2004). Lidské MSC dále potlačují imunitní odpověď produkcíIDO (indolamine 2,3-dioxygenase), která hraje důležitou roli

v inhibici T lymfocytů, inhibici maturace dendritických buněk a proliferaci NK (natural killer) buněk (Meisel et al., 2011). Kromě lidských MSC byla produkceIDO prokázána i u MSC izolovaných z opice a prasete. Naopak MSC z myši, krysa, křečka a králíka exprimují indukovanou syntézu oxidu dusnatého (iNOS, inducible nitric oxide synthase) (Su et al., 2014). Dále produkují například interleukin-6 (IL-6) a IL-10, a u lidí imunomodulační molekuly lidského leukocytárního antigenu G5 (Selmani et al., 2008).

MSC v prostředí se zvýšenou hladinou interferonu- γ (IFN- γ) a jiných prozánětlivých faktorů mohou způsobit inhibici T buněk pomocí produkce galektinu-9 (Gieseke et al., 2013). Kromě toho ovlivňují rovnováhu mezi pomocnými T buňkami 1 (Th1, T helper cell) a Th2 buňkami, a to ve prospěch odpovědi Th2 (Aggarwal and Pittenger, 2005). Dále působí na T lymfocyty pomocí zastavení jejich buněčného cyklu v G0/G1 fázi (Glennie et al., 2005)

MSC se také podílejí na snížení proliferace B buněk zastavením G0/G1 fáze buněčného cyklu a indukci apoptózy. Snižují jejich schopnost chemotaxe a inhibují produkci IgM, IgG a IgA protilátek (Corcione et al., 2006).

Další možností regulace imunitní odpovědi je inhibice migrace dendritických buněk a jejich prezentace antigenů (English et al., 2008). MSC mohou modulovat maturaci a funkci dendritických buněk pomocí sekrece cytokinů klíčových pro jejich vývoj. Jedná se o reversibilní proces, kdy MSC ovlivňují diferenciaci monocytů v dendritické buňky a regulují expresi CD1a, CD86, CD80. Zároveň potlačují sekreci IL-12 dendritickými buňkami (Jiang et al., 2005). MSC působí inhibičně také na NK buňky a regulují jejich cytotoxicitu a proliferaci (Spaggiari et al., 2008).

4.5 Mesenchymální kmenové buňky tukové tkáně a z kostní dřeni

Pro regenerativní medicínu se v poslední době zdají být výhodné především MSC tukové tkáně (AD-MS, adipose-derived mesenchymal stem cell) a kmenové buňky získané z kostní dřeni (BM-MS, bone marrow-derived mesenchymal stem cell).

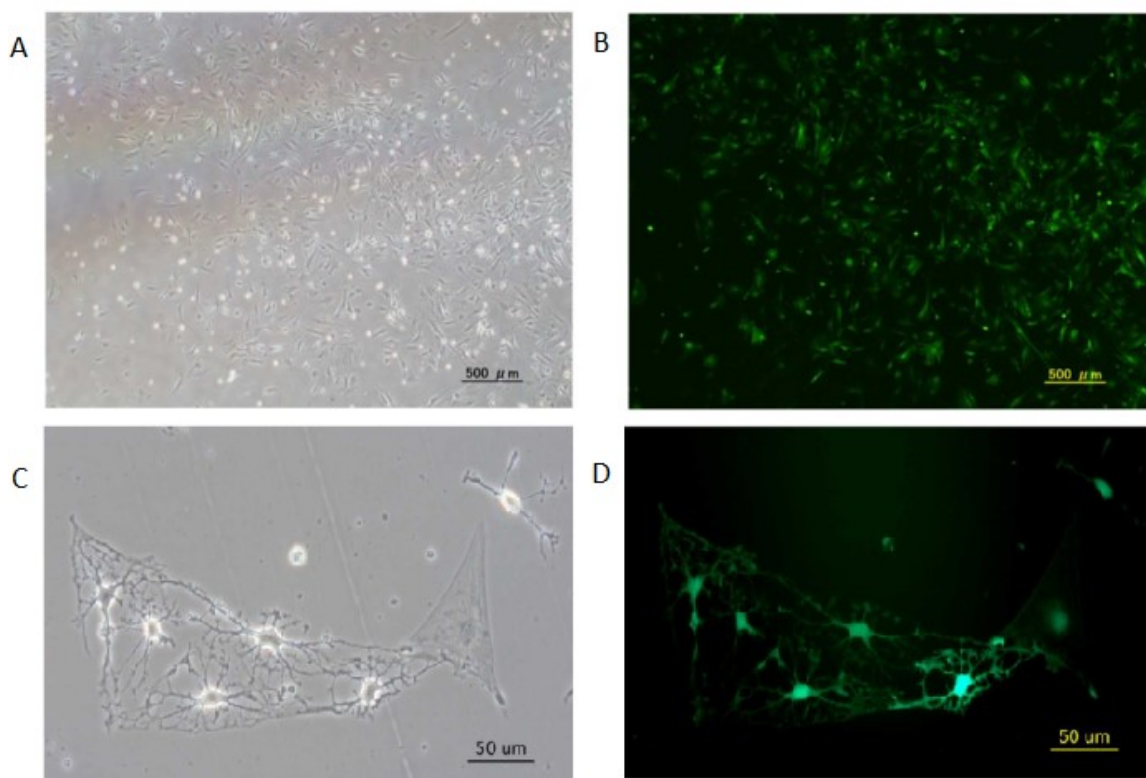
Velkou výhodou AD-MS je snadný přístup k jejich získání, který je minimálně invazivní a je možné je opakovat (Frese, 2016). Stejně jako BM-MS jsou i AD-MS schopné imunomodulace a inhibice diferenciac buněk imunitního systému. Na rozdíl od BM-MS je však jejich úroveň sekrece některých imunomodulačních cytokinů, jako je například IL-6 a TGF- β , vyšší. AD-MS mohou podobně jako BM-MS přeměrovat imunitní odpověď od Th1 k Th2 typu (Melief et al., 2013). Některé studie ukázaly, že proliferací schopnosti AD-MS jsou na rozdíl od BM-MS méně závislé na stáří buněk (Beane et al., 2014).

5. Experimentální modely

5.1 Příklady *in vitro* a *in vivo* diferenciací MSC v nervové buňky a buňky sítnice

Poškození a ztráta nervových buněk sítnice je jednou z příčin rozvoje DR. Diferenciací kmenových buněk v nervové buňky byla prokázána *in vitro* v několika pracích. Morfologické změny byly pozorovány u myších i lidských AD-MSCs, které byly vystaveny indukčnímu médiu obsahujícímu butylhydroxyanisol, kyselinu valproovou, forskolin, hydrokortizon a inzulin. Postupně docházelo k diferenciaci a tvorbě sférických struktur s výběžky u obou typů buněk. Po 5 – 6 hodinách došlo k velkému přeskupení v cytoskeletu a membránách diferencujících se buněk (Safford et al., 2002). V další práci byly studovány myší AD-MSCs. Při kultivaci v diferenciacním médiu, které bylo použito v předchozí studii, začala většina buněk vykazovat rychlé změny v morfologii a docházelo k formování kompaktního kulovitého tvaru s výběžky. Před expozicí indukčnímu médiu vykazovaly myší AD-MSCs nízkou expresi nestinu, synapsinu I a znaku pro napěťově řízený vápníkový kanál $\text{Pan } \alpha\text{-1}$. Po vystavení diferenciacnímu médiu došlo k nárůstu exprese nestinu, nárůstu gliového fibrilárního kyselého proteinu (GFAP, glial fibrillary acidic protein), navýšení exprese β -tubulinu III, MAP2 (microtubule-associated protein 2) a NeuN (neuronal nuclear protein) (Safford et al., 2004). I v další práci se myší AD-MSCs během pár hodin po neurální indukci zformovaly do buněk s bipolárními nebo i multipolárními výběžky, z nichž některé vytvořily mezi sebou kontakty (Obr. 3). Po indukci se také začaly tvořit mikrotubuly a tenčí aktinová mikrofilamenta (Fujimura et al., 2005).

Ve studii srovnávající diferenciaci lidských a myších AD-MSCs byly pomocí imunohistochemie 24 hodin od začátku indukce pozorovány u myších AD-MSCs zvýšené hladiny GFAP, nestinu a NeuN. GFAP bylo nalezeno v cytoplazmě i jádrech většiny buněk. U lidských AD-MSCs došlo k podobným změnám. Před počátkem indukce nevykazovaly expresi nestinu nebo NeuN, ale exprimovaly velmi malé množství intermediálních filament. Po 24 hodinách od indukce došlo u hladin těchto faktorů k velkému nárůstu (Safford et al., 2002). Myší AD-MSCs, které po indukci vytvořily bipolární výběžky, exprimovaly nestin, zatímco ty s multipolárními výběžky exprimovaly MAP2 nebo neurofilamenta-70, ale exprese nestinu u nich zaznamenána nebyla (Fujimura et al., 2005).



Obrázek 3: Diferenciace kmenových buněk. Primární nediferencovaná kultura AD-MSC – světelný mikroskop (A). Primární nediferencovaná kultura AD-MSC – fluorescenční mikroskop (B). Diferenciace AD-MSC 24 hodin po inkubaci s indukčním médiem – světelný mikroskop (C). Diferenciace AD-MSC 24 hodin po inkubaci s indukčním médiem – fluorescenční mikroskop (D) (převzato a upraveno z Fujimura et al., 2005).

Tyčinky a čípky v sítnici reagují na dopad světla a zajišťují barevné a černobílé vnímání. Jejich poškození během rozvoje DR tak výrazně zhoršuje kvalitu vidění. Proto je jejich nahrazení důležitou součástí léčby tohoto onemocnění. U myších MSC byla *in vitro* indukována diferenciace taurinem, epidermálním růstovým faktorem (EGF, epidermal growth factor) a activinem A. Část buněk expimovala specifické znaky pro fotoreceptory rodopsin, CRABP1 (cellular retinoic acid-binding protein 1) a nestin. Nebyly však nalezeny žádné buňky, které by byly pozitivní na PKC (Kicic et al., 2003). Lidské BM-MSC byly *in vitro* kultivovány s lidskými buňkami sítnicového pigmentového epitelu. BM-MSC vykazovaly dendritické tvary s dlouhými výběžky. Takto diferencované buňky byly pozitivní na PKC a opsin, které původní nediferencované BM-MSC nevykazovaly (Chiou et al., 2005). Myší BM-MSC po diferenciaci v prostředí simulujícím zánětlivou reakci sítnice expimovaly znaky typické pro Müllerovy buňky, epiteliální pigmentové buňky, horizontální a bipolární buňky a fotoreceptory. Expese těchto znaků byla zvýšená v přítomnosti IFN- γ (Hermankova et al., 2017). V další studii byly myší BM-MSC subretinálně podány do jednoho oka potkana s degenerací sítnice, zatímco

druhé oko sloužilo jako kontrola. Po 4 týdnech byla u léčené oblasti zevní ohraničující membrána dvakrát silnější než u kontrolní oblasti. Stejný výsledek byl i 8. týden po aplikaci. V místě vpichu byla nápadně vidět ochrana fotoreceptorů. Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) pak byla pozorována u sítnice s aplikovanými BM-MSK vyšší exprese myších genů *Crx* a *recoverinu*, typických pro fotoreceptory, než u kontrolní skupiny. Tyto geny však exprimovaly buňky příjemce, a ne dárcovské BM-MSK (Inoue et al., 2007).

Lidské MSC byly studovány pro jejich schopnost diferencovat se v epitelální pigmentové buňky. Po indukci v diferenciacním médiu byly u těchto buněk zaznamenány exprese bestrophiinu, cytokeratinu 8 a cytokeratinu 18. Tyto znaky jsou typické pro epitelální pigmentové buňky (Vossmerbaeumer et al., 2009). U potkanů s poškozenou sítnicí, kterým byly subretinálně podány alogenní BM-MSK, byly pozorovány u transplantovaných buněk znaky charakteristické pro fotoreceptory i pro epitelální pigmentové buňky (Huo et al., 2010).

V jiné studii byly potkanům s poškozenou sítnicí podány intravitálně alogenní BM-MSK. Po 8 týdnech od transplantace byly vnesené buňky nalezeny v zevní ohraničující membráně, vnitřní ohraničující membráně a ve vrstvě gangliových buněk. Aplikované BM-MSK, které se nacházely v zevní ohraničující membráně, vykazovaly schopnost diferenciacce ve fotoreceptory a bipolární buňky, díky expresi rhodopsinu a parvalbuminu. V této studii však nebyly nalezeny žádné buňky, které by vykazovaly znaky pro epitelální pigmentové buňky (Castanheira et al., 2008).

5.2 Migrace a integrace MSC do sítnice

Při použití kmenových buněk je důležitá jejich schopnost lokace a distribuce do místa poškození. Po alogenním podání MSC intravenózně do ocasní žíly bylo u myši s poškozenou sítnicí pomocí laseru nalezeno jen velmi malé množství vnesených buněk v subretinálním prostoru nebo na stěnách kapilár sítnice (Jiang et al., 2014).

Po intravitální aplikaci lidských AD-MSK myším s DR byla po 7 dnech od injekce velká část kmenových buněk nalezena v těsné blízkosti cévního zásobení sítnice. Část myši s DR byla po podání lidských AD-MSK značených zeleným fluorescenčním proteinem (GFP, green fluorescent protein) ponechána 21 dnů. Po této době byly dárcovské kmenové buňky nalezeny převážně v oblasti hostitelských kapilár. U zdravých jedinců byly pozorovány podobné výsledky, počet kmenových buněk byl však v oblasti kapilár významně nižší (Rajashekhar et al., 2014).

V další studii při použití myších AD-MSC ze zdravých jedinců a z jedinců s indukovaným DM nebyly při intravitreálním podání myším zaznamenány žádné rozdíly v jejich inkorporaci do sítnice, ale jejich lokalizace v oblasti cév byla rozdílná. Při intravitreálním použití myších AD-MSC izolovaných ze zdravých jedinců bylo přibližně 60% pozorovaných buněk nalezeno v perivaskulární oblasti. Podobná lokalizace byla pozorována i u myších AD-MSC izolovaných z jedinců postižených DM. V tomto případě se jich v perivaskulární oblasti nacházelo méně, což signalizuje preferenci organismu ke zdravým kmenovým buňkám (Cronk et al., 2015).

Při intravenózním podání lidských AD-MSC myším s vyvolaným DM byly po prvním týdnu od aplikace detekovány kmenové buňky pomocí protilátky anti-HuNu (anti-human nuclei antibody) především v zevní ohraničující membráně. Naopak méně jich bylo ve vnitřní ohraničující membráně a ve vrstvě gangliových buněk sítnice. Lidské AD-MSC byly schopny diferencovat se ve fotoreceptory i astrocyty. Podobné výsledky byly pozorovány i v dalších týdnech od aplikace, ale počet AD-MSC se postupně snižoval (Yang et al., 2010).

Po intravitreální aplikaci myších BM-MSC značených pomocí GFP, byly tyto buňky nalezeny v sítnici u myší s vyvolaným DM především ve vnitřní ohraničující membráně a ve vrstvě gangliových buněk. Podstatně méně BM-MSC bylo lokalizováno v zevní ohraničující membráně sítnice. V kontrolním zdravém oku byly za stejných podmínek kmenové buňky taktéž nalezeny v sítnici, bylo jich však méně (Çerman et al., 2016).

5.3 Regulace produkce neurotrofních a proangiogenních faktorů pomocí MSC

K poškození nervových buněk u sítnice postižené DR přispívá také snížení produkce růstových faktorů jako je například NGF. Kontrolní skupina zdravých myší vykazovala pozitivní expresi NGF především ve vrstvě gangliových buněk, slaběji pak v ostatních vrstvách sítnice. U skupiny neléčených myší došlo po dvou týdnech od indukce DR ke zvýšení exprese NGF v každé vrstvě sítnice. Po 4 týdnech se však začaly hodnoty snižovat a po 8. týdnech už byly nízké. U skupiny myší s DR, kterým byly podány intravitreálně lidské kmenové buňky izolované z pupečnickové krve (UMSC, umbilical cord mesenchymal stem cells) došlo po dvou týdnech k zvýšení produkce NGF a jeho hodnota dále stoupala až do 8. týdne od podání. U skupiny, které byla podána větší koncentrace UMSC byl nárůst znatelnější. Během 2. týdne byly hodnoty exprese NGF u léčených i neléčených jedinců s DR téměř stejné, rozdíly se začaly objevovat až během 4. týdne od podání (Kong et al., 2015).

Hladiny neurotrofních faktorů, jako je NGF, GDNF a bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF, basic fibroblast growth factor) byly 4. a také 12. týden od intravitreálního podání

myších MSC u myši s DM značně zvýšené na úrovni mRNA. Hodnota NGF a bFGF byla vyšší oproti zdravým jedincům i po 12. týdnech od aplikace a hladiny těchto faktorů byly pozorovány zvýšené i na úrovni proteinů. To však mohlo být způsobeno i samotnou hostitelskou tkání, která tímto způsobem mohla reagovat na transplantované alogenní MSC. Po 4. a 12. týdnu od podání MSC nebyly u jedinců s DM ve srovnání se zdravými jedinci pozorovány změny na úrovni mRNA proangiogenních faktorů VEGF- α , angioproteinu-1 a destičkového růstového faktoru (PDGF, platelet-derived growth factor). Naopak bylo pozorováno významné navýšení mRNA anti-angiogenetického faktoru trombospodinu-1 u nemocných jedinců. Pomocí metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bylo také potvrzeno zvýšení trombospodinu-1 na úrovni proteinů (Ezquer et al., 2016).

5.4 Vliv MSC na potlačení fibrovaskulárních jizev

Vznik fibrovaskulárních jizev zhoršuje u DR kvalitu vidění. U myši s poškozenou sítnicí laserem byl sledován vliv kmenových buněk na expresi GFAP. Při intravenózním podání myších MSC nebyla pozorována zvýšená exprese GFAP, zatímco u neléčené skupiny došlo k jejímu nárůstu 7. den po poškození sítnice (Jiang et al., 2014).

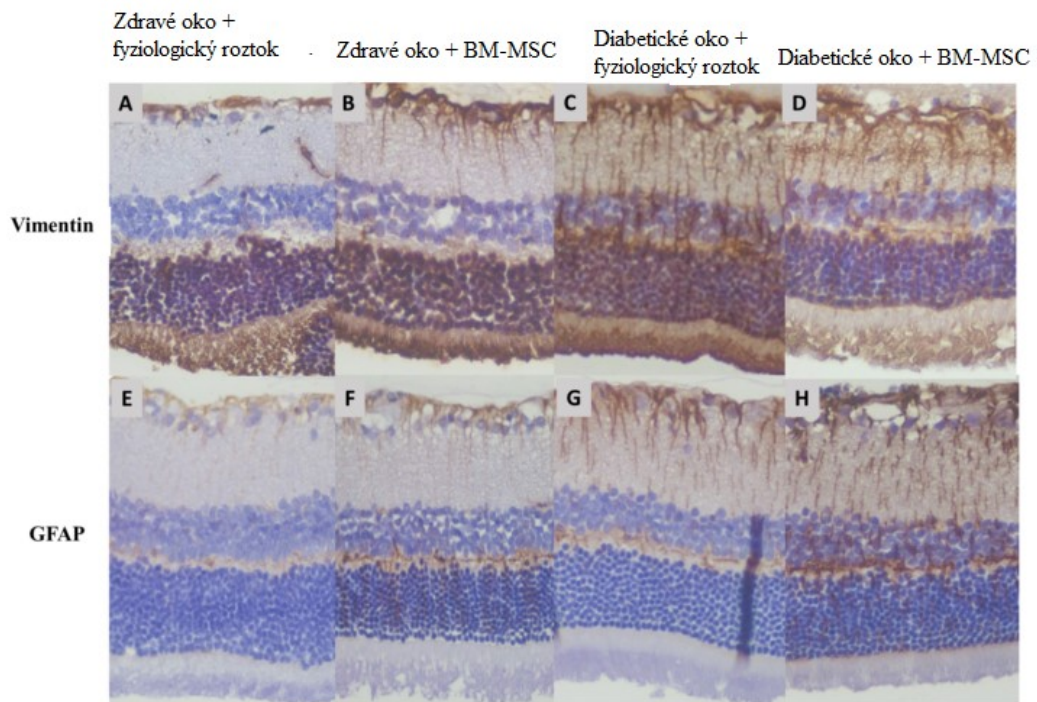
U myši s DR byly zaznamenány zvýšené hodnoty vimentinu a GFAP, které souvisely s tvorbou fibrovaskulárních jizev. Pomocí imunohistochemické analýzy byly porovnávány hodnoty exprese těchto proteinů po intravitreální aplikaci myších BM-MSK u sítnice postižené DR a u zdravé sítnice. U jedinců s DR léčených pomocí kmenových buněk došlo k částečnému poklesu exprese obou faktorů. Při aplikaci BM-MSK do zdravé sítnice bylo pozorováno snížení GFAP, ale naopak produkce vimentinu byla po podání kmenových buněk vyšší než u kontrolní skupiny (Obr. 4) (Çerman et al., 2016).

5.5 Vliv MSC na regulaci zánětu

Dalším faktorem vyskytujícím se během rozvoje DR je tvorba zánětlivé reakce. Kmenové buňky mají mnohé imunomodulační vlastnosti, kterými mohou tuto nežádoucí reakci potlačit. Potkanům s poškozenou sítnicí byly intravitreálně podány alogenní BM-MSK. Sedmý den od aplikace byl v krvi potkanů zaznamenán pokles lymfocytů. Snížení počtu monocytů bylo v krvi zaznamenáno už 3. den od podání (Bakondi et al., 2017).

U myši s DM byly v sítnici pozorovány pomocí qPCR (quantitative PCR) zvýšené hladiny CCL2, ICAM-1, EDN2 (endothelin 2 precursor), TIMP1 (TIMP metallopeptidase inhibitor 1), CRBB2 (crystallin beta B2), GAT3 (GABA transporter type 3), LAMA5 (laminin subunit alpha-5 gene) a GBP2 (guanylate binding protein 2). Tyto faktory se vyskytují ve

zvýšených hladinách v sítnici během zánětu. Po intravitreálním podání lidských AD-MSC došlo po 7 dnech k snížení jejich množství a tím i ochraně oka proti zánětu (Rajashekhar et al., 2014). V další studii byl u potkanů s ischemií sítnice zaznamenán po intravenózně podaných alogenních BM-MSC pokles prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-1 β a TNF- α (Mathew et al., 2017).



Obrázek 4: Vliv MSC na expresi vimentinu a GFAP. Expres vimentinu u zdravých myší s podaným fyziologickým roztokem (A), u zdravých myší s transplantovanými BM-MSC (B), u myší s DR, kterým byl podán fyziologický roztok (C) a u myší s DR, kterým byly podány BM-MSC (D). Expres GFAP u zdravých myší s podaným fyziologickým roztokem (E), u zdravých myší s transplantovanými BM-MSC (F), u myší s DR, kterým byl podán fyziologický roztok (G) a u myší s DR, kterým byly podány BM-MSC (H) (převzato a upraveno z Çerman et al., 2016).

5.6 Využití MSC k regulaci hladiny glukózy a úrovně ROS

Jednou z hlavních příčin DR je zvýšená hladina glukózy způsobující především nadměrnou produkci ROS, a proto jsou metody léčby často cílené na její regulaci. Při intravenózním podání lidských AD-MSCs myším byla zaznamenána během 4 týdnů snížená hladina glukózy oproti neléčeným jedincům, přesto však byla stále vyšší než u kontrolní zdravé skupiny (Yang et al., 2010). Pomocí MTT testu a měnících se dávek glukózy bylo pozorováno

in vitro, že lidské AD-MSC mohou odolat stresu způsobenému zvýšenou hladinou glukózy, aniž by docházelo ke změně proliferace a jejich schopnosti přežívání. Vysoké dávky glukózy neindukovaly v lidských AD-MSC aktivaci kaspázy-3, která se podílí na apoptóze (Rajashekhar et al., 2014).

U jedinců s indukovaným DM bylo sledováno navýšení úrovně ROS. To korelovalo s lipidickou peroxidací v sítnici, ale nebylo dostatečné k detekci oxidativního poškození na úrovni DNA a proteinů. Čtyři a 12 týdnů po intravitreálním podání myších MSC byly sledovány hodnoty hladiny ROS a dalších ukazatelů oxidativního poškození. Aplikace myších MSC indukovala nevýznamné snížení úrovně ROS v sítnici. Zároveň však byla pozorována redukce peroxidace lipidů po 4 i 12 týdnech od podání. Tato redukce se blížila až k úrovni zdravých jedinců (Ezquer et al., 2016).

5.7 Účinek MSC na stabilitu BRB

Dalším možným cílem léčby DR je ochrana BRB a zajištění zmírnění její propustnosti. U myší, kterým byla indukována DM byly po 12 týdnech podány intravenózně lidské AD-MSC. Po 1 týdnů od aplikace byly zaznamenány znatelně nižší hodnoty poškození BRB než u neléčených jedinců. Čtyři týdny od podání byly tyto rozdíly ještě patrnější a poškození BRB bylo téměř eliminováno (Yang et al., 2010).

V další studii při intravitreálním podání lidských AD-MSC myším s indukovanou DR došlo u léčené skupiny ke snížení propustnosti BRB, zatímco u skupiny, které byl místo lidských AD-MSC podán fyziologický roztok, došlo k výraznému navýšení propustnosti BRB (Rajashekhar et al., 2014). Při alogenní transplantaci intravitreálně podaných myších AD-MSC izolovaných ze zdravých jedinců bylo pozorováno zvýšení vaskulární denzity, zatímco aplikace kmenových buněk z jedinců s indukovaným DM naopak způsobila mírný pokles vaskulární denzity. V obou případech však nebyl zaznamenán rozvoj subretinální neovaskularizace v porovnání s kontrolní skupinou (Cronk et al., 2015).

5.8 Vliv MSC na apoptózu buněk

Během DR dochází ke značnému navýšení apoptózy a tím ztrátě důležitých buněk pro funkci sítnice. Schopnost přežívání kmenových buněk byla studována *in vitro*. Myší AD-MSC izolované z jedinců s DM měly oproti myším AD-MSC ze zdravých jedinců nižší proliferační aktivitu a docházelo u nich k častější apoptóze. Obě skupiny kmenových buněk však měly srovnatelnou úroveň buněčné respirace (Cronk et al., 2015).

U myši se sítnicí poškozenou pomocí laseru byly po transplantaci alogenních MSC pozorovány pomocí metody detekce apoptických DNA fragmentů (TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) apoptické buňky. Oproti neléčené skupině jich byla velká část redukována (Jiang et al., 2014). V další studii po 2 měsících od indukce DR byl zaznamenán pomocí TUNEL testu nárůst apoptózy buněk oproti zdravým jedincům. Většina TUNEL pozitivních buněk byla nalezena v kulturách izolovaných proximálně ke kapilárám a v kulturách z vrstvy gangliových buněk. Po intravitreálním podání lidských AD-MSC došlo během 7 dnů k významnému poklesu apoptózy buněk oproti neléčeným jedincům. U zdravé skupiny, které byly podány kmenové buňky, nebyly po aplikaci zaznamenány žádné změny (Rajashekhar et al., 2014).

Důležitou součástí zrakové dráhy jsou sítnicové gangliové buňky zajišťující výstupní signál ze sítnice. Během DR dochází k výrazné redukci počtu sítnicových gangliových buněk. Jedinci s indukovaným DM, kterým byly intravitreálně podány myši MSC však vykazovali shodný počet těchto buněk, jako zdravá skupina (Ezquer et al., 2016).

5.9 Působení MSC na celkové zlepšení vidění u jedinců s DR

Po provedení elektroretinografie (ERG) byla u jedinců s DM pozorována výrazná redukce amplitudy a-vln i b-vln ve srovnání se zdravými jedinci. Po intravitreálním podání myších MSC však nebylo zaznamenáno žádné zlepšení (Ezquer et al., 2016). V jiné studii však došlo 7 dnů po intravitreální aplikaci lidských AD-MSC k navrácení hodnot ERG téměř k normálu a tento stav zůstal neměnný i po 3 týdnech, což by značilo obnovení vidění (Rajashekhar et al., 2014).

5.10 Podobnost mezi pericyty a MSC

Během DR dochází už v počátečních stádiích ke ztrátě pericytů a jejich úbytek je důležitým faktorem při rozvoji DR. Jedná se o buňky nacházející se v okolí kapilár, které jsou mesodermálního původu. V několika studiích byla pozorována podobnost mezi MSC a pericyty (Fiori et al., 2018). Intravitreální podání myších AD-MSC napomohlo ve stabilizaci mikrovaskulatury sítnice, která byla při DR nestabilní, a zároveň bylo pozorováno zvýšení tloušťky cév. MSC jsou tak schopné nahradit pericyty a stabilizovat vaskularitu sítnice (Mendel et al., 2013). V další studii bylo zaznamenáno, že lidské pericyty byly schopné diferencovat se v osteoblasty, v této studii se však nediferencovaly v adipocyty ani chondroblasty (Herrmann et al., 2016). U lidských a myších pericytů byla studována jejich schopnost imunomodulace.

Podobně jako MSC byly pericyty schopny inhibovat sekreci zánětlivých faktorů a zabránit proliferaci T buněk (Tu et al., 2011).

5.11 Příklady použití iPSC a ESC pro léčbu DR

Mnoho studií se také v současné době zabývá využitím iPSC a ESC při léčbě DR. Stejně jako u MSC je u nich studována schopnost diferenciaci na buňky sítnice. Lidské iPSC byly kultivovány v diferenciacním médiu. Tyto buňky exprimovaly Pax6, Sox2 a Sox9. Většina buněk dále exprimovala nestin a další znaky pro buňky sítnice (Lamba et al., 2010). V další studii byly lidské iPSC diferencovány pomocí média obsahujícího molekuly indukující tvorbu buněk sítnice. Tyto buňky poté exprimovaly znaky charakteristické pro fotoreceptory a gangliové buňky a další buněčné typy sítnice. Indukované buňky byly dále subretinálně vneseny do oka myši. Po 8 týdnech byly diferencované fotoreceptory nalezeny integrované v sítnici hostitele (Zhu et al., 2018).

Jiná práce se zabývala použitím lidských ESC a jejich působením na cévní zásobování sítnice myši s DR. Do pravého oka hostitele byly intravitreálně vneseny lidské ESC, zatímco do levého oka fyziologický roztok. V průběhu týdne bylo pozorováno cévní poškození u sítnic s podaným kontrolním roztokem v porovnání se zdravou kontrolní skupinou, zatímco podání lidských ESC zlepšilo stav krevního zásobování sítnice. Transplantované ESC zaujaly typickou perivaskulární lokalizaci a i v hyperglykemickém prostředí zůstaly životaschopné. Lokalizace ESC byla víc znatelná u větších cév. Kmenové buňky po 2 týdnech nepronikly do hlubší vrstvy hostitelské sítnice, ale exprimovaly znaky pro pericyty. Po 4 týdnech od transplantace stále exprimovaly lidské MHC I molekuly (Kim et al., 2016). V další studii byly ESC izolované z potkana *in vitro* diferencovány v retinální progenitorové buňky. Ty byly poté subretinálně vneseny do potkanů s geneticky degenerovanou sítnicí. Po transplantaci bylo zaznamenáno, že podané retinální progenitorové buňky napomohly zlepšení struktury a schopnosti vidění (Qu et al., 2015)

6. Příklady klinických studií

6.1 Příklady probíhajících klinických studií využití kmenových buněk k léčbě poškození sítnice

V současné době probíhají 3 klinické studie zabývající se možnostmi léčby onemocnění sítnice pomocí intravitreálně podaných autologních BM-MSK a 1 studie sledující podání AD-MSK. Tyto studie jsou především v 1. a 2. fázi, kdy se zkoumá jejich bezpečnost a účinnost.

Studie se zaměřují na poškození sítnice v důsledku DR, retinitis pigmentosa (RP), glaukomu a dalších degenerativních onemocnění sítnice. Na začátku roku 2018 začala 1. fáze studie zabývající se využitím iPSC pro regeneraci poškozených cév u pacientů s DR. Dále probíhají tři studie sledující dlouhodobý účinek a bezpečnost subretinálního podání lidských ESC pacientům s makulární degenerací a Stargardtovy choroby (www.clinicaltrials.gov).

6.2 Příklady ukončených klinických studií využití kmenových buněk k léčbě poškození sítnice

V minulých letech proběhlo několik studií sledujících možnosti použití kmenových buněk pro léčbu poškození sítnice. Jedna z těchto studií se zabývala podáním BM-MSC pacientům s RP. Jedná se o onemocnění projevující se především ztrátou tyčinek a čípků v sítnici, což vede ke zhoršenému vidění až k úplné ztrátě zraku. Stejně jako u DR nebyla pro toto onemocnění vyvinuta speciální léčba, a proto je buněčná terapie pomocí kmenových buněk jednou z nadějných možností. Při intravitreálním podání BM-MSC pacientům s RP bylo zaznamenáno zlepšení stavu. Tato změna však nebyla u všech pacientů dlouhodobá (Siqueira et al., 2015).

V 1. fázi jiné studie, která se zabývala bezpečností intravitreálního podání autologních BM-MSC, nebyl u pacientů s degenerativním onemocněním sítnice po transplantaci zaznamenán vznik zánětu ani hyperproliferace. Podání kmenových buněk bylo tedy příjemci dobře tolerováno (Park et al., 2015)

V další studii byla pozorována účinnost a bezpečnost podání lidských ESC při věkem podmíněné makulární degeneraci a Stargardtově onemocnění. Po aplikaci ESC nebyly pozorovány v sítnici žádné komplikace, jako je například zvýšená proliferace nebo odmítnutí transplantovaných buněk (Schwartz et al., 2015).

7. Závěr

Při DR dochází k poškození a ztrátě buněk sítnice, což vede k zhoršení kvality zraku až oslepnutí. Léčba pomocí kmenových buněk se zdá být nadějnou možností zlepšení kvality života pacientů trpících tímto onemocněním. Pro buněčnou terapii je možné využít ESC, iPSC a kmenové buňky z dospělého organismu, ze kterých jsou pro léčbu používány především MSC.

MSC mají několik vhodných vlastností pro léčbu poškození sítnice. Mohou migrovat do místa poškození, diferencovat se v potřebné buněčné typy a nahradit tak chybějící buňky, a zároveň dokáží regulovat imunitní odpověď a zabránit zánětu. Další velkou výhodou je, že u jejich použití nebyla pozorována tvorba teratomů. MSC se nacházejí v celé řadě tkání a dají se relativně snadno izolovat. Nejčastěji používanými typy jsou BM-MSK a AD-MSK. AD-MSK mají výhodu ve snadné dostupnosti a opakovatelném přístupu.

V několika experimentálních pracích byl pozorován vliv kmenových buněk na léčbu poškození sítnice. Kmenové buňky jsou podávány například intravenózně, intravitreálně a subretinálně. V některých studiích bylo zaznamenáno, že při intravenózním podání bylo nalezeno méně transplantovaných MSC v hlubších vrstvách sítnice a v oblasti kapilár, než u intravitreální aplikace. Lokální aplikace tedy může být účinnější. V sítnici jsou MSC schopny nahradit a podpořit přežívání poškozených buněk. Jednou z hlavních příčin DR je ztráta nervových buněk. Bylo prokázáno, že MSC se mohou *in vitro* diferencovat v tyto buněčné typy. Dalším důležitým faktorem rozvoje DR je ztráta tyčinek a čípků sítnice. Diferenciace MSC ve fotoreceptory byla zaznamenána *in vitro*, zatímco *in vivo* bylo po subretinálním podání MSC pozorováno zvýšení exprese genů typických pro fotoreceptory, ale jednalo se o buňky příjemce. MSC tak pouze napomohly obnovení fotoreceptorů. V jiné experimentální studii však znaky charakteristické pro fotoreceptory vykazovaly i vnesené BM-MSK. Aplikace MSC navíc snížila apoptózu buněk sítnice. Pozorována byla diferenciace MSC i v další buněčné typy sítnice, jako jsou například epiteliální pigmentové buňky a bipolární buňky.

Dále bylo prokázáno, že MSC snížily v sítnici hladiny prozánětlivých faktorů, glukózy a ROS, které byly při DR zvýšené, a také regulovaly produkci neurotrofních a proangiogenních faktorů a faktorů souvisejících se vznikem fibrovaskulárních jizev. Velkou roli v rozvoji DR hraje poškození a zvýšená propustnost BRB. Podání MSC ve většině případů napomohlo její ochraně a snížení propustnosti. Byly však zaznamenány rozdíly mezi podáním MSC izolovaných ze zdravých jedinců a buněk izolovaných z myši postižených DR.

Klinické studie se momentálně zabývají především bezpečností aplikace kmenových buněk. Při transplantaci nebyly zaznamenány větší komplikace, pro zjištění celkové účinnosti léčby je však nutné provést větší počet studií.

8. Použitá literatura

*označují sekundární zdroje

Aggarwal, S. and Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*, 1815–1822.

Ali, T. K., Matragoon, S., Pillai, B. A., Liou, G. I., and El-Remessy, A. B. (2008). Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes*, *57*, 889–898.

*Alonso-Alonso, M. L. and Srivastava, G. K. (2015). Current focus of stem cell application in retinal repair, *World Journal of Stem Cells*, *7*, 641–648.

Bakondi, B., Girman, S., Lu, B. and Wang, S. (2017). Multimodal delivery of isogenic mesenchymal stem cells yields synergistic protection from retinal degeneration and vision loss. *Stem Cells Translational Medicine*, *6*, 444–457.

Beane, O. S., Fonseca, V. C., Cooper, L. L. and Koren, G. (2014). Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem / stromal cells. *PloS ONE*, *9*, 1–22.

*Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, *54*, 1615–1625.

Castanheira, P., Torquetti, L., Nehemy, M. B. and Goes, A. M. (2008). Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, *71*, 644–650.

Çerman, E., Akkoç, T., Eraslan, M., Özlem, Ş., and Özkara, S. (2016). Retinal electrophysiological effects of intravitreal bone marrow derived mesenchymal stem Cells in streptozotocin induced diabetic rats. *PLoS One*, *11*, e0156495, 1–23.

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*, 367–373.

Cronk, S. M., Kelly-Goss, M. R., Ray, H. C., Mendel, T. A., Hoehn, K. L., Bruce, A. C., Dey, B. K., Guendel A. M., Tavakol D. N. Herman I. M. Peirce S. M. and Yates, P. A. (2015). Adipose-derived stem cells from diabetic mice show impaired vascular stabilization in a murine model of diabetic retinopathy. *Stem Cells Translational Medicine*, *4*, 459–467.

*Das, U. N. (2016). Diabetic macular edema, retinopathy and age-related macular degeneration as inflammatory conditions. *Archives of Medical Science*, *12*, 1142–1157.

*Ding, D., Shyu, W. and Lin S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells, *Cell Transplantation*, *20*, 5–14.

*Ding, S. L. S., Kumar, S., and Mok, P. L. (2017). Cellular reparative mechanisms of mesenchymal stem cells for retinal diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, *18*, 1406

Dominici M. L., LeBlanc K., Mueller 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*, 315–317.

English, K., Barry, F. P., and Mahon, B. P. (2008). Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunology Letters*, *115*, 50–58.

English, K., Ryan, J. M., Tobin, L., Murphy, M. J., and Barry, F. P. (2009). Cell contact, prostaglandin E 2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD 4 + CD 25 high forkhead box P 3 + regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, *156*, 149–160.

*Ezquer, F., Ezquer, M., Arango-Rodriguez, M., and Conget, P. (2014). Could donor multipotent mesenchymal stromal cells prevent or delay the onset of diabetic retinopathy? *Acta Ophthalmologica*, *92*, e86-95.

Ezquer, M., Urzua, C. A., Montecino, S., Leal, K., Conget, P., and Ezquer, F. (2016). Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. *Stem Cell Research and Therapy*, *7*, 1–17.

*Feenstra, D. J., Yego, E. C., and Mohr, S. (2013). Modes of retinal cell death in diabetic retinopathy. *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*, *4*, 298.

Fiori, A., Terlizzi, V., Kremer, H., Gebauer, J., Hammes, H. P., Harmsen, M. C., and Bieback, K. (2018). Mesenchymal stromal/stem cells as potential therapy in diabetic retinopathy. *Immunobiology*, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.01.001>.

*Frese, L., Dijkman, E., and Hoerstrup, S. P. (2016). Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine, *Karger*, *43*, 268–274.

Fu, D., Yu, J. Y., Yang, S., Wu, M., Hammad, S. M., Connell, A. R., Du M., Chen J., and Lyons, T. J. (2016). Survival or death a dual role for autophagy in stress-induced pericyte loss in diabetic retinopathy. *Diabetologia*, *59*, 2251-2261.

Fujimura, J., Ogawa, R., Mizuno, H., Fukunaga, Y. and Suzuki, H. (2005). Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *333*, 116–121.

Gieseke, F., Kruchen, A., Tzaribachev, N., Bentzien, F., and Dominici, M. (2013). Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation. *European Journal of Immunology*, *43*, 2741–2749.

Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W. F., and Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, *105*, 2821–2827.

Gong, S. P., Kim, B., Kwon, H. S., Yang, W. S., Jeong, J. W., Ahn, J., and Lim, J. M. (2014). The co-injection of somatic cells with embryonic stem cells affects teratoma formation and the properties of teratoma-derived stem cell-like cells. *PLoS One*, *9*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105975>.

Hermankova, B., Kossel, J., Javorkova, E., Bohacova, P., Hajkova, M., Zajicova, A., Krulova, M., and Holan, V. (2017). The identification of interferon- γ as a key supportive factor for retinal differentiation of murine mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *26*, 1399–1408.

Herrmann M., Bara J. J., Sprecher C. M., Menzel U., Jalowiec J. M., Osinga R., Scherberich A., Alini M., and Verrier, S. (2016). Pericyte plasticity – comparative investigation of the angiogenic and multilineage potential of pericytes from different human tissues. *European Cells and Materials*, *31*, 236–249.

Huo, D.-M., Dong, F.-T., Yu, W.-H., and Gao, F. (2010). Differentiation of mesenchymal stem cell in the microenvironment of retinitis pigmentosa. *International Journal of Ophthalmology*, *3*, 216–219.

Chabannes D., Hill M., Merieau E., Rossignol J., Brion R., Soullillou J. P., Anegon I., and Cuturi, M. C. (2007). A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*, *110*, 3691–3694.

Chiou, S., Kao, C., Peng, C., Chen, S., Tarng, Y., Ku, H., Chen Y. C., Shyr Y. M., Liu R. S., Hsu C. J., Yang D. M., Hsu W. M., Kuo C. D., and Lee, C. (2005). A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *326*, 578–585.

Inoue, Y., Iriyama, A., Ueno, S., Takahashi, H., and Kondo, M. (2007). Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, *85*, 234–241.

Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D., and Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, *105*, 4120–4126.

Jiang, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Wang, M., and Zhang, X. (2014). Therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells on laser-induced retinal injury in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*, 9372–9385.

*Kanji, S., and Das, H. (2017). Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 1–14.

Kicic, A., Shen, W.-Y., Wilson, A. S., Constable, I. J., Robertson, T., and Rakoczy, P. E. (2003). Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *The Journal of Neuroscience*, *23*, 7742–7749.

Kim, J. M., Hong, K.-S., Song, W. K., Bae, D., Hwang, I.-K., Kim, J. S., and Chung, H.-M. (2016). Perivascular progenitor cells derived from human embryonic stem cells exhibit

functional characteristics of pericytes and improve the retinal vasculature in a rodent model of diabetic retinopathy. *Stem Cells Translational Medicine*, 5, 1268–1276.

Kong, J.-H., Zheng, D., Chen, S., Duan, H.-T., Wang, Y.-X., Dong, M., and Song, J. (2015). A comparative study on the transplantation of different concentrations of human umbilical mesenchymal cells. *International Journal of Ophthalmology*, 8, 257–262.

Lamba, D. A., Mcusic, A., Hirata, R. K., Wang, P., Russell, D., and Thomas, A. (2010). Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells, *PLoS One*, 5, e8763.

*Mahla, R. S. (2016). Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, <https://doi.org/10.1155/2016/6940283>.

Martin, P. M., Roon, P., Van Ells, T. K., Ganapathy, V., and Smith, S. B. (2004). Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45, 3330–3336.

*Masuda, T., Shimazawa, M., and Hara, H. (2017). Retinal diseases associated with oxidative stress and the effects of a free radical scavenger. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, <https://doi.org/10.1155/2017/9208489>.

Mathew B., Poston J. N., Dreixler J. C., Torres L., Lopez J., Zelkha R., Balyasnikova I., Lesniak M. S., and Roth, S. (2017). Bone-marrow mesenchymal stem-cell administration significantly improves outcome after retinal ischemia in rats. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 255, 1581–1592.

*Mbata, O., El-Magd, N. F. A., and El-Remessy, A. B. (2017). Obesity, metabolic syndrome and diabetic retinopathy: Beyond hyperglycemia. *World Journal of Diabetes*, 8, <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i7.317>.

*Megaw, R., and Dhillon, B. (2014). Stem cell therapies in the management of diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reports*, 14, <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0498-9>.

Meisel R. S B., Heseler K., Degistrici O., Bulle H., Woite C., Stuhlsatz S., Schwippert W., Jäger M., Sorg R., Henschler R., Seissler J., Dilloo D., and Daubner, W. (2011). Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Leukemia*, 25, 648–654.

Melief, S. M., Zwaginga, J. J., Fibbe, W. E., and Roelofs, H. (2013). Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Translational Medicine*, 2, 455–463.

Mendel T. A., Clabough E. B. D., Kao D. S., Demidova-Rice T. N., Durham J. T., Zotter B. C., Seaman, S. A., Cronk S. M., Rakoczy E. P., Katz A. J., Herman I. M., Peirce S. M., and Yates, P. A. (2013). Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy. *PLoS One*, 8, 1–11.

*Minhas, G., Sharma, J., and Khan, N. (2016). Cellular stress response and immune signaling in retinal ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in Immunology*, 7, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00444>.

Neuss, S., Becher, E., Woltje, M., Tietze, L., and Jahnen-Dechent, W. (2004). Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells*, 22, 405–414.

*Ng, T. K., and Yung, J. S. (2015). Research progress and human clinical trials of mesenchymal stem cells in ophthalmology : A mini review, *SM Ophthalmology Journal*, 1, 1–9.

Park, S. S. (2016). Cell therapy applications for retinal vascular diseases: Diabetic retinopathy and retinal vein occlusion. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57, 1-10.

Park, S. S., Bauer, G., Abedi, M., Pontow, S., Panorgias, A., Jonnal, R., Zawadzki, R. J., Werner, J. S., and Nolta, J. (2015). Intravitreal autologous bone marrow CD34+ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: Preliminary phase 1 clinical trial findings. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56, 81–89.

*Preeti, C., and Brayman, K. L. (2013). Stem cell therapy to cure type 1 Diabetes: From hype to hope. *Stem Cells Translational Medicine*, 2, 328–336.

Qu, Z., Guan, Y., Cui, L., Song, J., Gu, J., Zhao, H., Xu, L., Lu, L., Jin, Y., and Xu, G.-T. (2015). Transplantation of rat embryonic stem cell-derived retinal progenitor cells preserves the retinal structure and function in rat retinal degeneration. *Stem Cell Research and Therapy*, 6, 219.

Rajashekhar, G., Ramadan, A., Abburi, C., Callaghan, B., Traktuev, D. O., Evans-Molina, C., Maturi, R., Harris, A., Kern, T. S., and March, K. L. (2014). Regenerative therapeutic potential of adipose stromal cells in early stage diabetic retinopathy. *PLoS One*, 9, e84671.

Ryan, J. M., Barry, F., and Murphy, J. M. (2007). Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 149, 353–363.

Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. C., Wilkison, W. O., Gimble, J. M., and Rice, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294, 371–379.

Safford, K. M., Safford, S. D., Gimble, J. M., Shetty, A. K., and Rice, H. E. (2004). Characterization of neuronal / glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells, *Experimental Neurology*, 187, 319–328.

*Salam, A., Mathew, R., and Sivaprasad, S. (2011). Treatment of proliferative diabetic retinopathy with anti-VEGF agents. *Acta Ophthalmologica*, 89, 405-411.

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, 228–235.

Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E., D., and Deschaseaux, F. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*, *26*, 212–222.

Schwartz, S. D., Regillo, C. D., Lam, B. L., Elliott, D., Rosenfeld, P. J., Gregori, N. Z., Hubschman, J. P., Davis, J. L., Heilwell, G., Sporn, M., Maguire, J., Gay, R., Bateman, J., Ostrick, R. M., Morris, D., Vincent, M., Anglade, E., Del Priore, L.V., and Lanza, R. (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet*, *385*, 509–516.

Siqueira, R. C., Messias, A., Messias, K., Arcieri, R. S., Ruiz, M. A., Souza, N. F., Martins L. C., and Jorge, R. (2015). Quality of life in patients with retinitis pigmentosa submitted to intravitreal use of bone marrow-derived stem cells (Reticell -clinical trial), *Stem Cell Research and Therapy*, *6*, 1–5.

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*, 1327–1333.

Su, J., Chen, X., Huang, Y., Li, W., Li, J., Cao, K., Cao, G., Zhang, L., Li, F., Roberts, A. I., Kang, H., Yu, P., Ren, G., Ji, W., and Wang, Y. (2014). Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death and Differentiation*, *21*, 388–396.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, *2*, 663–676.

*Venkatramani, J., and Mitchell, P. (2004). Ocular and systemic causes of retinopathy in patients without diabetes mellitus. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, *328*, 625–629.

Vossmerbaeumer, U., Ohnesorge, S., Kuehl, S., Haapalahti, M., Kluter, H., Jonas, J., Thierse, H. J., and Bieback, K. (2009). Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *11*, 177–188.

*Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., and Zhang, W. (2014). Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International Journal of Medical Sciences*, *11*, 1185-1200.

Yang, Z., Li, K., Yan, X., Dong, F., and Zhao, C. (2010). Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefes's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *248*, 1415–1422.

Zhu, J., Reynolds, J., Garcia, T., Cifuentes, H., Chew, S., Zeng, X., and Lamba, D. A. (2018). Generation of Transplantable Retinal Photoreceptors from a Current Good Manufacturing

Practice-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cell Line. *Stem Cells Translational Medicine*, 7, 210–219.

*Zomer, H. D., Vidane, A. Z., Goncalves, N. N., and Ambrósio, C. E. (2015). Mesenchymal and induced pluripotent stem cells : general insights and clinical perspectives, *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, 125–134.