

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Regenerace pohybového aparátu kmenovými buňkami

Bakalářská práce

2024

Barbora Ulčáková

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Regeneration of the Musculoskeletal System by Stem Cells

Bachelor Thesis

2024

Barbora Ulčáková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Ulčáková**
Osobní číslo: **C21255**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Regenerace pohybového aparátu kmenovými buňkami**
Téma práce anglicky: **Regeneration of the Musculoskeletal System by Stem Cells**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zkompilujte literární rešerši zaměřenou na možnosti regenerace pohybového aparátu s využitím kmenových buněk. V úvodní části bakalářské práce se pokuste definovat kmenové buňky, charakterizujte jejich vlastnosti a popište *niche* kmenových buněk. Podrobněji se věnujte mezenchymálním kmenovým buňkám.
2. V hlavní části práce popište využití kmenových buněk k terapii při poškození pohybového aparátu nejen u lidí, ale také u zvířat. Definujte, u jakých onemocnění či poškození pohybového aparátu lze o využití kmenových buněk uvažovat. Vyzdvihněte aktuální klinické studie, které se zabývají využitím kmenových buněk v rámci léčby pohybového aparátu. Podrobněji se věnujte klinickým studiím a terapii kmenovými buňkami u koní. Zhodnoťte možnosti potenciálních aplikací kmenových buněk u lidí.
3. Jako primární zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Regenerace pohybového aparátu kmenovými buňkami**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28. 06. 2024

Barbora Ulčáková v.r.

Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Jiřímu Handlovi, PhD. za ochotu, pomoc a podporu při vypracování této práce, za trpělivost a odporné rady. Velice ráda bych poděkovala i MVDr. Miroslavovi Trundovi, za poskytnutí sonografických obrázků a informací z praxe.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na terapeutický potenciál mezenchymálních kmenových buněk ve veterinární medicíně koní a medicíně lidí. Kmenové buňky jsou v úvodu práce nejprve charakterizovány a zároveň je popsána schopnost jejich diferenciaci. Práce je následně zaměřena na pohybový aparát koní a jeho poruchy, které je možné léčit právě pomocí mezenchymálních kmenových buněk. V závěrečné části práce jsou shrnuty možnosti využití mezenchymálních kmenových buněk u lidí se zaměřením na některá autoimunitní a neurodegenerativní onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

mezenchymální kmenové buňky, pohybový aparát, poškození pohybového aparátu, terapie kmenovými buňkami

TITLE

Regeneration of the Musculoskeletal System by Stem Cells

ANNOTATION

The bachelor's thesis is focused on the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in equine and human medicine. First are described the properties and differentiation capacity of stem cells. Next, the thesis focuses on the equine musculoskeletal system and its disorders that can be treated with mesenchymal stem cells and that are encountered in practice. The final part of the thesis is devoted to the possibilities of using mesenchymal stem cells in human medicine, focusing on some autoimmune and neurodegenerative diseases.

KEYWORDS

mesenchymal stem cells, musculoskeletal system, musculoskeletal disorders, stem cell therapy

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	10
ÚVOD.....	12
1. KMENOVÉ BUŇKY.....	13
1.1. TOTIPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY	17
1.2. PLURIPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY	17
1.3. MULTIPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY	17
1.4. UNIPOTENTNÍ A OLIGOPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY	18
2. KULTIVACE.....	19
2.1 DVOUROZMĚRNÁ KULTIVACE PLURIPOTENTNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK	19
2.2 DVOUROZMĚRNÁ KULTIVACE MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK	20
2.3 TROJROZMĚRNÉ KULTIVACE KMENOVÝCH BUNĚK	20
2.3.1 Sféroidy	21
2.3.2 Biomateriály.....	21
2.3.2.1 Scaffoldy v tkáňovém inženýrství kmenových buněk	21
2.3.2.2 Kyselina hyaluronová.....	22
2.3.2.3 Kmenové buňky a kolagen	23
3 MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY.....	24
3.3 KOMUNIKACE MSC S POŠKOZENOU TKÁNÍ	24
3.4 DIFERENCIACE MSC.....	25
3.4.2 Diferenciace osteoblastů	26
3.4.3 Diferenciace chondrocytů	27
3.5 IMUNOMODULACE MSC	28
4 VYUŽITÍ MSC VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ KONÍ.....	30
4.3 IZOLACE MSC U KONÍ	31
4.4 KOSTERNÍ SYSTÉM KONÍ.....	32
4.5 SVALOVÝ SYSTÉM	33
4.6 ŠLACHY A VAZY.....	34
4.7 PORANĚNÍ ŠLACH.....	34
4.8 PORANĚNÍ CHRUPAVKY	40
4.9 LAMINITIDA	43
5 VYUŽITÍ MSC V MEDICÍNĚ LIDÍ.....	46
5.1 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ A LÉČBA MSC	47
5.1.1 Primární Sjögrenův syndrom	47
5.1.3 Léčba roztroušené sklerózy pomocí MSC	49
5.2 NEUROLOGICKÉ ONEMOCNĚNÍ LÉČENÁ POMOCÍ MSC.....	50
5.2.1 Léčba Alzheimerovy choroby pomocí MSC.....	50
5.2.2 Huntingtonova choroba a léčba pomocí MSC	51
ZÁVĚR.....	53
POUŽITÁ LITERATURA.....	54

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Popis dělení embryonálních kmenových buněk.....	16
Obrázek 2: Izolace MSC z psiho žloutkového vaku získané z plodu.....	20
Obrázek 3: Diferenciace mezenchymálních kmenových buněk.....	28
Obrázek 4: Sonografický obrázek poraněné šlachy.....	37
Obrázek 5: Sonografický obrázek poraněné šlachy po podání MSC	38
Obrázek 6: Sonografický obrázek zahojené šlachy	39
Obrázek 7: Ošetřená noha po podání MSC	40
Obrázek 8: Rozdíl mezi zdravým kloubem a kloubem poškozeným	42
Obrázek 9: Rentgenový snímek při léčbě laminitidy.....	45
Tabulka 1 – Faktory indukující diferenciaci MSC do specifické linie.....	26

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A β	amyloid beta
AD	Alzheimerova choroba (<i>Alzheimer's disease</i>)
AD-MSC	mezenchymální kmenové buňky odvezené z tukové tkáně
BM-MSC	mezenchymální kmenové buňky odvozené z kostní dřeně
CCP	kolagen – fosforečnan vápenatý
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CG	kolagen-glykosaminglykan
CNS	centrální nervová soustava
ECM	extracelulární matrix
HA	kyselina hyaluronová
HAS-1	hyaluron syntetáza 1
HAS-2	hyaluron syntetáza 2
HAS-3	hyaluron syntetáza 3
HCS	krvetvorné kmenové buňky
HD	Huntingtonova choroba (<i>Huntington's disease</i>)
ICM	vnitřní buněčná hmota
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky
miRNA	mitochondriální RNA
MSC	mezenchymální kmenové buňky
NCS	nervové kmenové buňky
NK	přírození zabijáci (<i>Natural Killer's</i>)
PRP	plazma bohatá na destičky
pSS	primární Sjögrenův syndrom
RS	roztroušená skleróza
SMC	hladká svalová buňka
Tfh	folikulární pomocné T-lymfocyty
TGF - α	transformující růstový faktor alfa

Th1	diferenciované T-lymfocyty
Th17	diferenciované lymfocyty
Treg	regulační T-lymfocyty
VEGF	cévní endoteliální růstový faktor

ÚVOD

Potenciál kmenových buněk představuje slibnou budoucnost v terapii řady onemocnění. V dnešní době jsou kmenové buňky využívány k léčbě různých neurodegenerativních onemocnění, autoimunitních onemocnění nebo k léčbě onemocnění pohybového aparátu. Nejdůležitější schopností těchto buněk je jejich sebeobnova a možnost diferenciací ve specifické linii tkání, ve kterých se nacházejí. V rámci terapie různých onemocnění je jejich důležitou vlastností i schopnost zmírnění zánětu. Kmenové buňky se dělí na buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní, oligopotentní a unipotentní. Největší úspěch v buněčné terapii mají mezenchymální kmenové buňky (MSC), které se mohou diferenciovat v různé specifické buňky jako jsou osteoblasty, chondrocyty nebo adipocyty. Mimo schopnost diferenciací je velkou výhodou možnost jejich izolace z různých tkání, buňky můžeme získat z tkáně tukové, kostní dřevě, periferní krve nebo i krve pupečnickové. Kmenové buňky jsou hojně využívány i ve veterinární medicíně koní, hlavně pro terapii poruch pohybového aparátu, který je pro koně stěžejní. Nejčastěji jsou využívány právě MSC, a to k léčbě tenditid neboli zánětu šlach, osteoartritidy a některé studie se pokouší o léčbu zlomenin pomocí MSC.

I když je terapie pomocí kmenových buněk hodně slibná, není však přesný mechanismus jejich funkčnosti objasněn, a proto nejsou plně schváleny k léčbě veškerých onemocnění. Tato práce se zaměřuje na využití terapeutického účinku MSC pro léčbu nejběžnějších poruch pohybového aparátu u koní, kde je potenciál těchto buněk nejvíce využit. A zároveň nastiňuje terapeutické využití v klasické medicíně, kde se nejčastěji setkáváme s léčbou neurodegenerativních a autoimunitních onemocnění.

1. Kmenové buňky

Kmenové buňky představují soubor buněk, ze kterých se vytvářejí jednotlivé orgány a tkáně. Vznikají v časně fázi ontogeneze a v dospělosti pak přetrvávají v tkáni tukové, kostní dřeni, krvi nebo pupečníku. Kmenové buňky jsou schopny sebeobnovy a diferenciaci ve specifické druhy buněk (Filip 2006, Tian 2023). Buňky se dělí asymetrickým dělením, tudíž z jedné mateřské buňky vznikají dvě buňky dceřiné, jedna z buněk dceřiných je fenotypově totožná s buňkou mateřskou, mají tedy stejné vlastnosti. Druhá buňka dceřiná je více diferencovaná a může vytvářet specializované struktury. Kmenové buňky si zachovávají schopnost dělit se i symetricky při potřebě organismu, kdy mitotickým dělením vznikají z jedné mateřské buňky dvě buňky dceřiné neboli fenotypově stejné kmenové buňky jako je ta mateřská (Smetana 2010).

Ve tkáních nalézáme specifické mikroprostředí označované jako „*niche*“, ve kterém se kmenové buňky nacházejí. Toto mikroprostředí obsahuje růstové faktory, stromální buňky a extracelulární matrix (ECM), tvořeno vláknitými proteiny jako je fibrin, elastin a kolagen, který tvoří až 30 % celého EMC. Jeho další součástí jsou proteoglykany a glykosaminoglykany, kam patří kyselina hyaluronová, buňka je zde tak regulována a uchovávána. Při zničení tohoto mikroprostředí se kmenová buňka diferencuje v buňky tkáně a ztrácí své kmenové vlastnosti (Čedíková 2012, Ylostalo 2020).

Hlavními faktory ECM, které ovlivňují obměňování chování kmenových buněk jsou jeho mechanické vlastnosti, biochemické struktury a jeho mikroprostředí. Mechanické vlastnosti EMC se zaslouhují i o mezibuněčné signální dráhy, tvar jádra buněk i jejich šíření. Chování kmenových buněk je z velké části ovlivněno i interakcemi mezi buňkami. Buňky jsou schopny se navzájem ovlivňovat pomocí sekrece rozpustných faktorů, čímž jsou pak modulovány biochemické dráhy, které řídí diferenciaci kmenových buněk do zralých fenotypů (Mandl 2018).

Mimo „*niche*“, které regulují dospělé kmenové buňky se setkáváme i s „*niche*“ embryonálním vytvořením během vývoje, to je zodpovědné za dozrávání prekurzorů v dospělé kmenové buňku. „*Niche*“ krevních kmenových buněk (HSC) je nejvíce pochopena z hlediska vzniku nových systémů, v tomto případě krevních buněk. Nejprve vznikají primitivní krevní buňky, které jsou dostatečné pro embryo. Dospělé krevní buňky vznikají z HSC, které jsou tvořeny konečnou krvetvorbou. Fetální HSC se nachází v játrech, z nichž se pak přemísťují do „*niche*“ v kostní dřeni, a tam zůstávají v klidovém stavu. Vlastnosti „*niche*“, které zprostředkovávají interakci buněk nebo mechanismus matrice

a mnoho dalších, inspirovaly tvorbu hydrogelových platforem, což jsou prostředky využívané v 3D kultivaci, zároveň se v budoucnu tyto platformy měly používat pro tvorbu orgánotypových modelů buněčných kultur (Hicks 2022).

U kmenových buněk je jednou z velice důležitých vlastností jejich plasticita. Dospělé kmenové buňky jsou schopny produkovat takové tkáně, ze kterých samy pocházejí, např. krvetvorné kmenové buňky (HSC) produkují krevní elementy. Aktuální vědecké studie však ukazují, že dospělé kmenové buňky jsou schopny tvořit buňky jiného typu, než jaké jsou původně ve tkáni. Příkladem mohou být právě HSC, u kterých bylo zjištěno, že mohou dát vzniku nejen krevním, ale i jaterním buňkám. S plasticitou se můžeme setkat i u nervových kmenových buňkách (NSC), které dávají vzniknout nejen buňkám mozku, ale i hematopoetickým prekurzorům (Lakshmipathy 2005). Plasticita kmenových buněk se využívá pro buněčnou terapii, největší potenciál zde mají NSC, které se používají při léčbě neurologických onemocnění, jako je třeba Parkinsonova choroba nebo Alzheimerova choroba, mohou se využívat i při testování neurotoxicity (Ottoboni 2020).

Kmenové buňky se rozdělují do čtyř skupin podle toho, jak moc jsou schopné se diferenciovat, dělí se na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní (obr.1), dalším možné dělení je podle původu na dospělé a embryonální (Kalra 2014, Sobhani 2017).

Totipotentní kmenové buňky se mohou diferenciovat do veškerých možných typů buněk, jsou to například blastomery, které vzniknou ze zygoty. Jako jediné se tyto buňky umí diferenciovat v placentu. Pluripotentní kmenové buňky se rozdělují do různých buněčných fenotypů, charakter pluripotentních buněk mají hlavně embryonální kmenové buňky, které se nachází v blastocystě, kromě embryonálních buněk jsou i buňky odvozené z ektodermu, mezodermu i endodermu. Multipotentní kmenové buňky jsou tvořeny diferenciací kmenových buněk pluripotentních, příkladem těchto buněk mohou být HSC, mezenchymální kmenové buňky (MSC) i NSC, tudíž jsou tyto buňky orgánově specifické. Unipotentní kmenové buňky vznikají diferenciací buněk multipotentních, tyto buňky mohou produkovat pouze jeden druh buněk např. Spermatozoidy. Můžeme se setkat i s tzv. buňkami oligopotentními, které stejně jako buňky pluripotentní vznikají diferenciací buněk multipotentních a jsou schopné se dělit v dospělé myeloidní a lymfoidní kmenové buňky (Filip 2006, Kalra 2014, Alessandrini 2019).

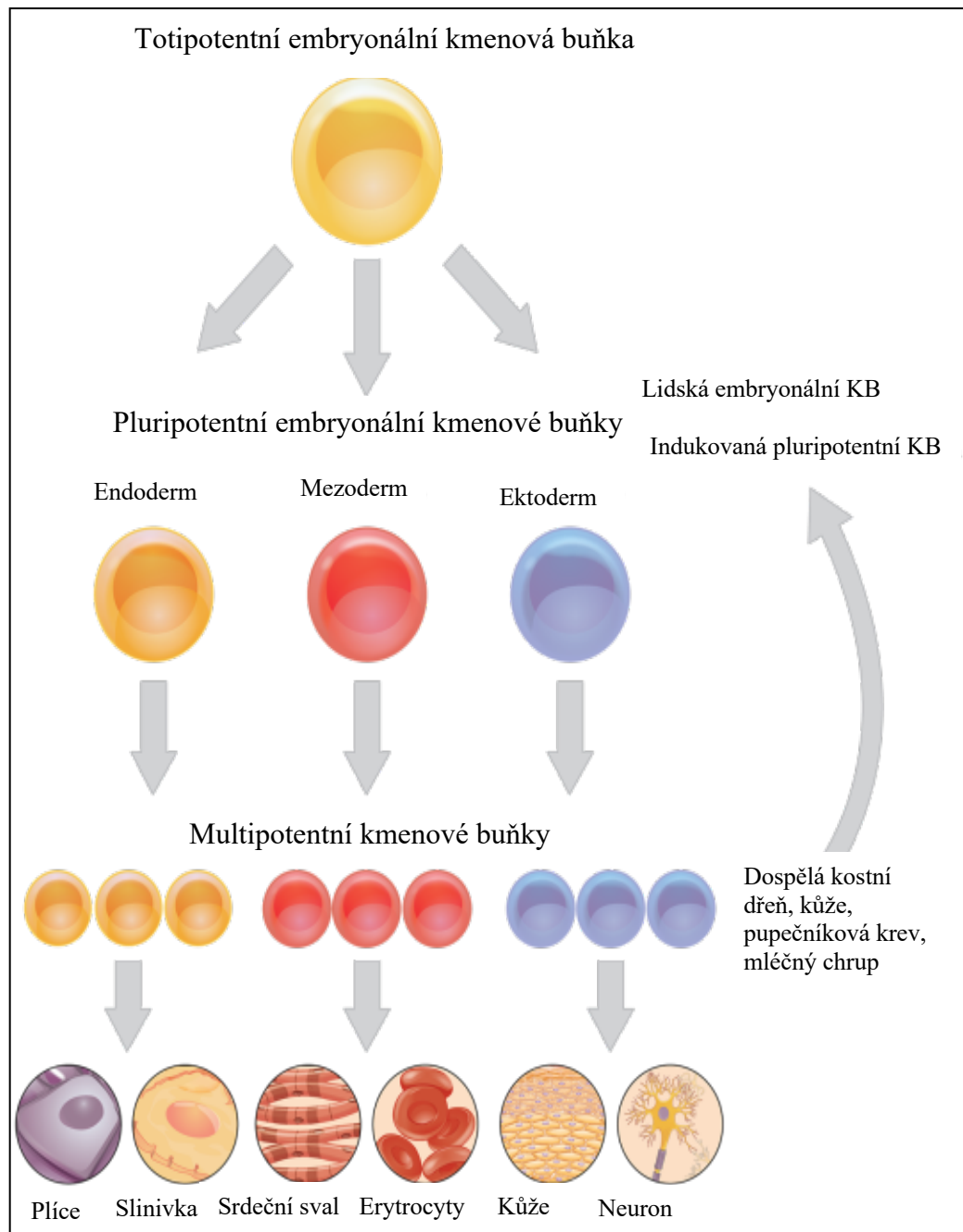
V dnešní době se kmenové buňky využívají hlavně v regenerativní medicíně jak u lidí, tak u zvířat. V terapiích pomocí kmenovými buňkami u lidí se nejvíce využívají mezenchymální kmenové buňky. Příkladem může být podání alogenních MSC při poškození plic endotoxinem *E. coli*. Právě podání MSC v tomto případě snížilo zahuštění sputa a extravaskulární tekutiny, zlepšil se transport alveolární tekutiny a v alveolárních kompartmentech byla zlepšena

rovnováha tekutin. V mnoha studiích bylo prokázáno, že lidské MSC mohou inhibovat proliferaci a tvorbu koloidních nádorových buněčných linií díky downregulaci antiapoptického Bcl-2. Velkou protinádorovou roli hrají MSC v souvislosti s Kaposiho sarkomy, kdy inhibují PI3K/AKT, což je signální dráha důležitá při regulaci buněčného cyklu. V případě karcinomu prsu bylo dále prokázáno, že MSC migrují směrem ke kondiciovanému médiu vznikajícímu z nádorových buněk až 11krát rychleji než ke kondiciovanému médiu z buněk nenádorových. MSC jsou využívány i k léčbě neurologických onemocnění jako je Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba (Alessandrini 2019, Zakrzewski 2019).

Kmenové buňky se využívají hojně i ve veterinární medicíně pro léčbu kolitidy u koní, neurodegenerativních onemocnění, poškození jater nebo i při studiu degenerativního onemocnění sítnice. Hojně se využívá terapie MSC u koní k léčbě pohybového aparátu, používají se MSC odebrané z kostní dřene k léčbě poraněné šlachy, kdy jsou MSC chirurgicky či kolagenázou indukovány do lézí šlach. Při terapii kmenovými buňkami se setkáváme i s různými komplikacemi, ve většině případů se jedná o progresi onemocnění i přes podání buněčné léčby (Fortier 2011).

U krysího modelu degenerace sítnice byla zvýšena životaschopnost fotoreceptorových buněk po injekci MSC do subretinálního prostoru, zvýšení excizního hojení ran byla prokázána u myší po aplikaci média, které bylo obohacené o cytokiny a chemokiny kondiciovaného roztoku MSC, díky čemuž došlo ke zvýšení infiltrace makrofágů a endoteliálních buněk do poraněného místa. Můžeme se setkat s nežádoucími projevy u léčby COVID-19 pomocí MSC, kdy docházelo ke srážení krve u 12 % případů. Jiným příkladem může být ztráta zraku u pacientů s věkem podmíněnou makulární degenerací i navzdory podání MSC tukového původu pro léčbu choroby. Mezenchymální kmenové buňky by mohly podporovat tromboembolismus skrze prokoagulačního tkáňového faktoru. I přes úspěšné terapie nemocí kmenovými buňkami, není jejich mechanismus zcela objasněn, je tudíž potřeba jej zcela objasnit před začleněním této terapie do běžné medicíny (Stagg 2008, Shammaa 2020).

Vývoj embryonální kmenové buňky



Obrázek 1: **Popis dělení embryonálních kmenových buněk** – od totipotentní embryonální kmenové buňky, po plně specializovanou tkáň (upraveno dle, Betts 2022).

1.1. Totipotentní kmenové buňky

Totipotentní kmenové buňky mají největší schopnost diferenciaci, jsou důležité pro tvorbu celého embrya. Tyto buňky jsou schopny produkovat vnitřní buněčnou hmotu (ICM) a trofektoderm, ICM je důležitá pro tvorbu embryonálního těla a trofektoderm se podílí na tvorbě placenty. Běžně se tyto buňky nachází ve stádiu pozdní zygoty nebo v blastomerách dvoubuněčných či čtyř buněčných embryí (Ghazimoradi 2022).

1.2. Pluripotentní kmenové buňky

Pluripotentní kmenové buňky se diferencují ve tři zárodečné listy: ektoderm, mezoderm, endoderm, ze kterých je organismus formován. Buňky pocházejí z vnitřní buněčné hmoty (IMC) blastocysty. Pozornost je hlavně věnována embryonálním kmenovým buňkám, které se využívají pro buněčnou terapii nebo pro screening léčiv. Dříve byly tyto buňky získávány od myši, dnes se je však daří získat i od lidí nebo primátů. Myší embryonální pluripotentní kmenové buňky jsou schopny embryogeneze i po tom co, jsou delší dobu uchovávány *in vitro* a následně přesunuty do preimplementačního embrya, což je pro dnešní výzkum velice zajímavé (Montoya – Ulloa 2005).

Významným pokrokem byl objev přetransformování somatických buněk na buňky embryonální, které jsou pluripotentní, těmto buňkám se říká indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC). iPSC se mohou získávat z fibroblastů, vlasových folikulů nebo keratinocytů pacienta. Výhodou těchto buněk, především je to že si zachovávají genetickou výbavu dárce, tudíž se dají dobře použít pro studium onemocnění genetického původu (Soliman 2017). Pro regenerativní medicínu je důležité, zda jsou iPSC stejné i dobře použitelné jako ESC, studie se shodují, že tyto buňky jsou si velice podobné a odlišnost je pouze v malých procentech, není však prokázáno, jestli i malé procento odlišnosti je podstatné pro terapie nebo jestli může být zanedbáno (Chin 2009).

1.3. Multipotentní kmenové buňky

Multipotentní kmenové buňky se diferencují do jednoho ze zárodečných listů. Mezi tyto buňky patří např. hematopoetické kmenové buňky, mesenchymální kmenové buňky, mohou to být i kosterní myoblasty. Přirozeně se podílí na procesu hojení, obrany a zastávají úlohu předešlých poškozených buněk. Při poškození tkáně se v daném místě zvyšuje počet chemokinů a dochází ke zvýraznění jejich receptorů, proto se pak multipotentní kmenové buňky pohybují směrem k poškozené tkáni. Tyto buňky mohou být aplikovány jako terapie pro plicní a kardiovaskulární onemocnění, při autoimunitních chorobách, poranění míchy

či nádorovém onemocnění. Multipotentní kmenové buňky se vyznačují přítomností různých markerů na svém povrchu, např. CD105 či CD90. Jedná se převážně o proteiny sloužící k odlišení buněk (Kolios 2012).

Z multipotentních kmenových buněk jsou nejvýznamnější MSC, které se získávají z kostní dřeně, pupečníku, periferní krve nebo tuku a mohou diferencovat v chrupavku, sval nebo kost. MSC mohou být výhodou u transplantací, protože ještě před aplikací jsou diferencovány v potřebné buňky a tím se snižuje riziko odmítnutí nebo vznik nádoru. Terapie těmito buňkami sebou nesou i jistá nebezpečí, jelikož mesenchymální kmenové buňky vytváří mitogenní proteinů jako je IGF-1, TGF – α nebo základní fibroblastový růstový faktor a mnoho dalších, tyto proteiny indukují buněčnou proliferaci (Mirzaei 2017, Sobhani 2017).

1.4. Unipotentní a oligopotentní kmenové buňky

Oligopotentní kmenové buňky mají nízkou schopnost diferenciace. Dělí se v buňky podobného typu, příkladem může být buňka myeloidní, které se diferencují v buňky bílých krvinek, ale ne v červené krevní buňky. Unipotentní kmenové buňky mají nejnižší schopnost dělení, jsou schopné se dělit pouze v jednu specifickou buňku, např. Spermatogonii. Stejně jako multipotentní kmenové buňky se tyto buňky vyskytují v celém organismu a podílejí na udržení stálosti vnitřního prostředí – homeostázy (Díaz 2022, Rajabzadeh 2019, Ilic 2011, Zakrzewski 2019).

2. Kultivace

Většinou se kmenové buňky kultivují na plastových miskách, které často potřebují xenogenní materiál, při jehož výrobě dochází k odstranění organických látek a zabraňuje špatným imunologickým reakcím. Dále kultivační médium obsahuje růstové faktory, cytokiny a substráty potřebné pro uchycení buněk. Při kultivaci je potřeba provádět pravidelné pasážování, což je přenesení buněk do nových misek, v rámci zachování buněčné sebeobnovy. Kultivace na plastových miskách se provádí ve dvourozměrných (2D) i trojrozměrných systémech. Dvourozměrné kultivace umožňuje buňkám růst v ploché podobě, podávají informace hlavně o tom, co je pro růst SCs potřeba. Tím, že buňky během 2D kultivace rostou v monovrstvách může docházet tedy ke zploštění buněk a k následné změně jejich vnitřní stavby cytoskeletu a tvaru jádra, docházet může i ke změnám ve formulaci genu. Tato kultivace kmenových buněk se využívá pro umělou diferenciaci SCs do specializovaných buněk jako jsou osteocyty, adipocyty či chondrocyty. Podmínky dvourozměrných kultivací však nejsou dostatečné pro přesné napodobení „*niche*“ kmenových buněk, které je potřebné pro buněčnou komunikaci, zprostředkování živin a kyslíku. Důležitou součástí „*niche*“ je EMC, které ovlivňuje chování kmenových buněk. Kvůli nedostatkům, se kterými se setkáváme u dvojrozměrných kultivací byly vytvořené 3D kultivace, které se specializují na co nejpřesnější napodobení složení ECM a celkového mikroprostředí „*niche*“ (McKee 2017, Kamiri 2016).

2.1 Dvourozměrná kultivace pluripotentních kmenových buněk

Pluripotentní kmenová buňky se kultivují na plastových miskách, které obsahují kolagen nebo želatinu, které jsou součástí EMC. Mimo tyto složky je možné buňky kultivovat na myších embryonálních fibroblastech, které jsou důležité pro uchycení. Pro udržení pluripotence lidských kmenových buněk je nutné do kultivačního média přidat fibroblastový růstový faktor 2, transformující růstový faktor $\beta 1$ a leukemický inhibiční faktor. V poslední době se do kultivačních médií přidávají i inhibitory ROCK, což jsou Rho kinázové inhibitory, které zabraňují programované buněčné smrti čímž zvyšují množení buněk. Ve dvourozměrné kultivaci se pozornost věnuje i rovnoměrnému rozpínání ESC, kterého se dosahuje přidáním různých substrátů jako je lidský rekombinantní protein vitronecin či médium E8, kromě těchto substrátů se přidávají i xeno – free kultivační média (Motta 2023, Pangjantuk 2024).

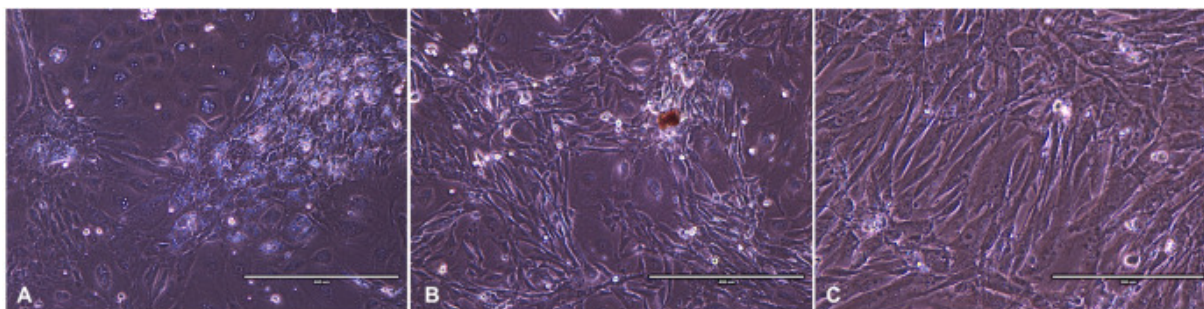
2.2 Dvourozměrná kultivace mesenchymálních kmenových buněk

Mezenchymální kmenové buňky jsou přirozeně více přiléhavé nežli buňky embryonální, proto není potřeba přidávat xenogenní prvky. Kmenovost MSC se zvyšuje vytvořením hypoxie, kde podmínky jsou 2 % O₂, a zvýšení kmenovosti vede ke většímu množení buněk, aniž by byla ovlivněna jejich schopnost diferenciaci po celou dobu kultivace. Při rozpínání MSC se setkáváme s morfologickými změnami buněk, když se z vřetenovitého tvaru buňky stává tvar zploštělý, což má za následek změnu jejich schopnosti diferenciaci. Při dvourozměrné kultivaci bylo zjištěno, že MSC se mohou diferenciovat i na buňky fotoreceptorů, na buňky nervové či na buňky podobné pankreatickým ostrůvkům (Motta 2023, Pangjantuk 2024).

2.3 Trojrozměrné kultivace kmenových buněk

Trojrozměrné kultivace (3D) (obr.2) poskytují buňkám lepší napodobení jejich přirozeného komplexního mikroprostředí nežli dvourozměrné kultivační misky. Buňky v 3D kultivaci spolu mohou lépe interagovat nežli v 2D kultivaci a jsou schopny mít svůj přirozený tvar, tudíž se lépe množí a diferencují do organoidů, což jsou složité shluky orgánově specifických buněk. Tyto organoidy se využívají hlavně pro výzkum regenerace tkání a udržení homeostázy.

Buňky jsou během 3D kultivace inkapsulované ve scaffoldech nebo hydrogelech, ty podporují jejich strukturu a napodobují přirozené ECM. Díky biokompatibilitě a snadné výrobě jsou hydrogely stejně jako scaffoldy hojně využívány v tkáňovém inženýrství a buněčné terapii (Motta 2023, Pangjantuk 2024).



Obrázek 2: Izolace MSC z psiho žloutkového vaku získané z plodu ve věku 25–35 dnů. Po třetí pasáži měly buňky pouze fibroblastický tvar (upraveno dle, Motta 2023).

2.3.1 Sféroidy

Jednou z nejjednodušších metod 3D kultivace je použitím sféroidů, které kmenovým buňkám umožňují interakci s ECM. Sféroidy jsou tvořeny apoptotickými, proliferativními i neproliferativními buňkami a nachází se v nich zvýšené hypoxické prostředí. Pluripotentní kmenové buňky jsou uměle diferencovány v trojrozměrné sféroidy neboli v embryonální tělíska, ze kterých se následně mohou diferencovat do tří zárodečných listů. Při pozorování buněčné specializace kardiomyocytů bylo zjištěno, že počet i velikost embryonálních tělísek může mít vliv na diferenciaci. Mezoderm a endoderm se diferencují spíše z větších embryonálních tělísek, naopak ektoderm se diferencují spíše z menších embryonálních tělísek. Při kultivaci MSC ve 3D sféroidech se zvyšuje a jejich multipotentnost, mění se exprese jejich miRNA a zvyšuje se acetylace u pluripotentních genech. V krátkodobé kultuře MSC sféroidy obsahovaly vysokou expresi protinádorových faktorů jako je CD82, TNF- α nebo stanniokalcin. Dlouhodobá kultivace sféroidů SCs může vést k tvorbě nekrotických center (McKee 2017, Pangjantuk 2024).

2.3.2 Biomateriály

Biomateriály napodobují biofyzikální a biochemické vlastnosti „*niche*“ kmenových buněk, proto se často používají v *in vitro* kultivacích. Buňkám pomáhají usměrnit sebeobnovu či diferenciaci do specifických buněk. Mezi používané přírodní biologické materiály patří např. kyselina hyaluronová, alginát, kolagen 1, fibronectin nebo agaróza. Jedním z nejvyužívanějších biologických materiálů je alginát, který je netoxický, biokompatibilní a imunogenní. Hydrogely s alginátem se používají pro výzkum MSC. Stejně se využívá i kyselina hyaluronová, která má protizánětlivé a angiogenezní účinky. Setkáváme se i syntetickými biologickými materiály, které jsou tvořeny syntetickými polymery jako je např. polyethylen glykol, poly-L-lysine, kyselina polyglykolová či polykaprolakton. Tyto materiály se používají ve 3D scaffoldech, což je tkáňový nosič, které udržují a podporují diferenciaci kmenových buněk a zároveň tlumí buněčnou agregaci, která může negativně ovlivnit růst SCs což může mít za následek apoptózu či nekrózu. Scaffoldy se vytváří elektrospiningem, 3D tiskem nebo litím do rozpouštědel a mohou obsahovat růstové i rozpustné faktory (McKee 2017, Pangjantuk 2024).

2.3.2.1 Scaffoldy v tkáňovém inženýrství kmenových buněk

3D scaffoldy lze vyrobit z mnoha přírodních nebo syntetických materiálů ve formě kuliček nebo ve formě bloků, které mají definovaný tvar. Na jejich výrobu jsou použity různé materiály jako je kolagen, alginát, mohou obsahovat i hedvábní nebo fibrin (Knight 2014, Paim

2018). Kuličky jsou většinou používány k výplni měkkých tkání v chrupavkovém nebo tukovém tkáňovém inženýrství. Vlastnosti 3D scaffoldů jako je biokompatibilita, mechanická odolnost nebo rychlost degradace lze upravit díky použití biodegradabilních polymerních směsí. Struktura a chemické složení scaffoldů může ovlivnit jak buněčnou proliferaci, tak i diferenciaci. Důležitá je pórovitost těchto scaffoldů, které mají přímý vliv na přísun živin buňkám, na buněčnou signalizaci či lokální pH. Se zvýšením pórovitosti se zvyšuje proliferace, diferenciace a infiltrace buněk. V některých případech to může vést ke špatné mechanické odolnosti, a proto je potřeba pórovitost materiálu optimalizovat tak, aby poskytovala dostatečnou možnost buňkám interagovat a zároveň poskytovala dostatečnou mechanickou odolnost (Paim 2018).

Nevýhodou scaffoldů, které jsou tvořeny z přírodních materiálů je jejich biodegradace nežádoucím prvkem, což může ovlivňovat aktivitu buněk. Mezi další nevýhody může patřit omezení mechanických vlastností nebo variabilita šarží. Oproti tomu scaffoldy ze syntetických materiálů mají výhodu v pevně definovaném chemickém složení. Syntetické scaffoldy obsahují i biomateriály jako je titan nebo materiály na bázi keramiky. Tyto scaffoldy sice podporují reprodukovatelnost buněk, ale na druhou stranu mohou postrádat místa pro buněčnou adhezi (Knight 2014).

2.3.2.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je součástí glykosaminoglykanů EMC a má schopnost interakce s povrchovými receptory SCs, což podporuje jejich diferenciace. Největší účinnost má na MSC, u nichž je nejvíce podpořena diferenciace v chondrogenní, osteogenní či adipogenní buňky. Hlavní struktura HA je tvořena disacharidovými jednotkami D-GlcA, které jsou spojené $\beta(1\rightarrow3)$ s GlcNA. HA je produkována v cytoplazmatické membráně obojživelníku a savců třemi enzymy, HAS-1, HAS-2 a HAS-3, které se od sebe liší molekulovou hmotností a katalytickou aktivitou. Mimo obojživelníky a savce se HA vyskytuje i u bakteriálních kmenů, zejména u streptokoků.

Polysacharidová struktura HA má schopnost vytvářet viskózní roztoky díky své vysoké molekulové hmotnosti a hydrofilní povaze. Tyto roztoky se využívají v biomedicíně především jako nosiče buněk. V biologickém prostředí se kyselina hyaluronová snadno rozkládá, tudíž vytvořené viskózní roztoky nejsou příliš pevné, proto byla HA vystavena různým chemickým modifikacím, ke kterým se využívají akryláty, thioláty nebo metakryláty. Tyto chemické modifikace se zaměřují na zvýšení molekulové hmotnosti, aby roztoky byly viskóznější nebo případně vznikly gely, které mohou v těle působit déle, aniž by ovlivňovaly

interakce mezi buňkami. Hydrogely založené na bázi kyseliny hyaluronové mají lepší bioaktivitu, biokompatibilitu a využívají při terapii onemocnění jater nebo osteoartrózy (López-Ruis 2019, Hamilton 2021, Gopal 2020).

2.3.2.3 Kmenové buňky a kolagen

Kolagen patří mezi jeden z nejpoužívanějších biomateriálů. Přirozeně se v těle nachází v pojivých tkáních, včetně kostí, šlach nebo kůži. Jeho výhodou je, že vykazuje nízkou imunitní reakci, rychle se v těle vstřebává a není toxický. Je tudíž skvělým biokompatibilním materiálem s dobrou pevností a pružností pro různé aplikace. Zároveň stimuluje mezibuněčnou komunikaci, zlepšuje adhezi buněk k povrchu a usnadňuje obnovu mikroenvironmentálního prostředí „*niche*“. V dnešní době se kolagenové přípravky nejvíce využívají k hojení ran a regeneraci poškozené chrupavky. S jeho použitím se setkáme i v kosmetice, kde je podáván v injekční formě. Membrány na bázi kolagenu se používají i v periodontální léčbě, a to jako bariery bránící migraci epitelálních buněk (Sekula 2018).

Studie, kterou napsal G. Lyons a kol. se zabývala srovnáním dvou scaffoldy, které byly vyvinuty na bázi kolagenu pro opravu kostí. Jeden z nich byl na bázi kolagen-glykosaminoglykanu (CG) a druhý byl na bázi kolagenu – fosforečnanu vápenatého (CCP). Oba typy materiálů byly vyráběny pomocí lyofilizace při -40°C technikou konstantního chlazení. Podle výsledků přítomnost osteoinduktivní minerální fáze, která je obsažena v CCP scaffoldech zvyšuje a urychluje hojení a tvorbu nové kosti a zároveň zvyšuje tuhost naproti ve srovnání s CG scaffoldy ve, kterých minerální fáze chybí (Lyons 2010).

3 Mesenchymální kmenové buňky

Mesenchymální kmenové buňky patří do skupiny multipotentních kmenových buněk, které se diferencují do jednoho ze tří zárodečných listů. Jsou to buňky stromální, které mají schopnost sebeobnovy a diferenciaci. MSC se izolují z různých tkání např. pupečnicková krev, periferní krev, kostní dřeň, tuková tkáň, poslední studie naznačují možnost získání těchto buněk i z krve menstruační a endometria (Ding 2011). Tvarově se MSC podobají fibroblastům. K odlišení HSC a MSC se používají *Cluster of differentiation* (CD), což jsou nejčastěji proteiny nebo glykoproteiny na povrchu buněk. MSC nemají na svém povrchu CD14, CD34, CD11b, CD45, CD79 α nebo CD19 markery, které se nachází na povrchu buněk HSC naopak MSC na svém povrchu mají CD73, CD90 a CD105 markery. Specifický pro MSC je antigen STRO-1, což je gen pro proteinový marker. V kostní dřeni je populace MSC méně než 0,01 % ze všech buněk. Frekvence MSC při narození je cca 1 MSC/105 BM mononukleárů, tato hodnota se snižuje během stárnutí, v dospělosti je frekvence MSC 1 MSC/105 BM mononukleárních buněk a okolo 80 let se jejich frekvence sníží na 1 MSC/212 buněk BM mononukleárů. MSC mohou být aktivovány a přeneseny do místa, kde je tkáň poškozena, jsou schopny tkáň regenerovat a opravit její defekty. Za specifických podmínek se mezenchymální kmenové buňky mohou diferencovat do více buněčných typů (Shamma 2020, Ma 2014).

3.3 Komunikace MSC s poškozenou tkání

Při poškození tkání dochází k aktivaci zánětlivých buněk jako jsou makrofágy, neutrofilů, CD4⁺ T a CD8⁺ T buňky. Tyto buňky jsou získávány z nekrotických a apoptotických buněk. Zánětlivé buňky spolu s fibroblasty řídí změny v mikroprostředí, což způsobí diferenciaci MSC do poškozené tkáně. Mechanismus diferenciaci MSC ve specializované buňky není přesně popsán, avšak v momentě, kdy se MSC dostanou do mikroprostředí poškozené tkáně, tak jsou aktivovány různé faktory jako jsou TNF- α , IL-1, IFN- γ , které stimulují růstové faktory MSC např. faktor odvozený od destiček (PDGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), hepatocytární růstový faktor (HGF), či angiopoetin-1 (Ang-1). Mezenchymální kmenové buňky migrují krevními cévami a vstěpují se do cílových tkání pomocí faktorů, adhezivních molekul, cytokinů, chemokinů a matrixové metaloproteinázy. MSC exprimují řadu chemokinových receptorů např. C-C chemokinový receptor 1 (CCR1), chemokinový receptor 2, chemokinový receptor 4, chemokinový receptor 6, chemokinový receptor 7, C-X-C chemokinový receptor 1, C-X-C chemokinový receptor 2. Velkou roli v migraci a navádění MSC v reakci na faktor 1 odvozený od stromálních buněk (SDF1) má C-X-C chemokinový receptor 4, který je z 83-98 % exprimován intracelulárně a jen

s malým podílem na buněčné membráně. Migraci MSC do poškozených tkání zvyšuje přítomnost různých cytokinů a růstových faktorů např. tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF1) a hepatocytární růstový faktor (HGF), zároveň tyto faktory zvyšují expresi C-X-C chemokinového receptoru 4. Kromě těchto růstových faktorů a cytokininů je migrace MSC ovlivněna hlavními proteinovými složkami komplementu C3a a C5a, ty jsou schopné řídit migraci lidských stromálních mezenchymálních kmenových buněk (hMSC) do poškozené tkáně a tím je urychlena regenerace. Poškozené tkáně uvolňují enzym Glycin-tRNA syntetázu (GRS), který katalyzuje jeden z prvních kroků syntézy proteinů. Tento enzym podporuje migraci, diferenciaci a terapeutický účinek MSC na jaterní cirhózu prostřednictvím vazby na kadherin 6 (CDH-6) (Ma 2014, Wang 2022).

3.4 Diferenciace MSC

Mezenchymální kmenové buňky se diferencují ve specifické buněčné linie mezodermu, ektodermu nebo endodermu. Mezi ně řadíme například buňky tukové, kostní, chondrocytární, svalové či nervové (obr.3). Na diferenciaci se podílejí transkripční faktory a různé regulační geny. K MSC se při diferenciaci na osteoblasty přidává vitamin D3, kyselina askorbová nebo β -glycerinfosfát, případně se místo vitamínu D3 používá dexametazon, což je glukokortikoid. Přirozeně lidské mezenchymální kmenové buňky vylučují matrix obsahující kolagen typu I., tato matrix se aktivuje pomocí tkáňově nespecifické alkalické fosfatázy (TNAP), po aktivaci se mineralizují krystaly apatitu. Z osteoblastů je vylučován tkáňově specifický protein zvaný osteokalcin, který se podílí na kontrole sekrece inzulínu. Osteokalcin je dobrý marker pro diferenciaci osteoblastů, však přímo na tvorbě kosti se nepodílí. Osteoblasty jsou schopny se obklopit mineralizovanou kolagenní matrix a dále se vyvíjet v osteocyty. Diferenciace MSC do buněčných typů se účastní mnoho inhibitorů a podnětů a je řízena cytokininy, růstovými faktory molekulami ECM a transkripčními faktory. *In vitro* se pro diferenciaci přidává k MSC mnoho induktorů (tabulka 1) (Fakhry 2013, Ding 2011).

Tabulka 1 – Faktory indukující diferenciaci MSC do specifické linie (upraveno dle, Almalki 2016).

Induktor	Koncentrace	Efekt	Směr diferenciaci
Dexametazon + 3-isobutyl-1-methylxantin + insulin	1 μ M 0,5 mM 0,01 mg/ml	Zvýšení ukládání tuku v cytoplasmě	Adipocyty
Kyselina askorbová + dexametazon	50 μ M 100 nM	Zvýšení aktivity alkalické fosfatázy	Osteocyty
TGF-β1 + kyselina askorbová + dexametazon	10 ng/ml 50 μ g/ml 100 nM	Zvýšení aktivity alkalické fosfatázy	Chondrocyty
TGF-β1	1, 2, 5 a 10 ng/ml	Stimulace genů pro expresi SMC	Hladké svalové buňky
5 - azacytidin	3 μ M 10 μ M	Inhibice DNA methyltransferázy	Kardiomyocyty
VEGF	10, 50 ng/ml	Fosforylace VEGF-RII a zvýšení jeho aktivity	Endoteliální buňky

3.4.2 Diferenciaci osteoblastů

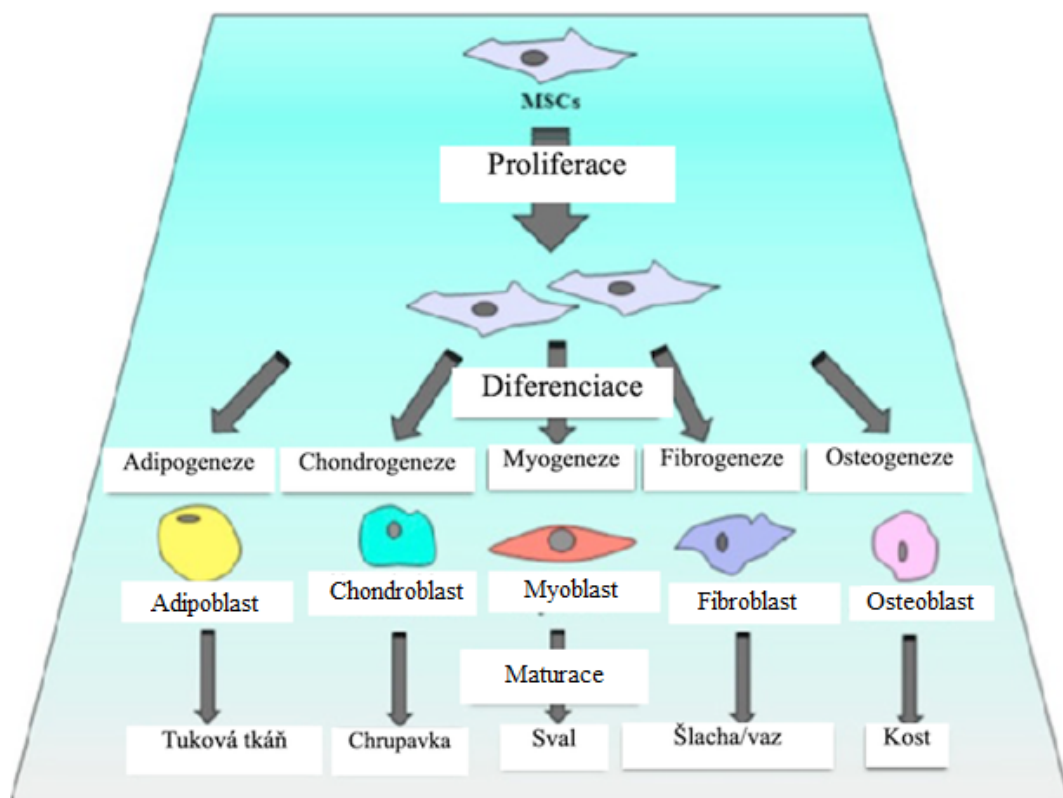
Na diferenciaci osteoblastů z mezenchymálních kmenových buněk se podílí dvě hlavní rodiny růstových faktorů, rodina Wnt a kostní a morfologické proteiny. Wnt je rodina devatenácti sekretovaných glykoproteinů, které se aktivně účastní vývoje a homeostázy tkání. Z Wnt proteinů je důležitý Wnt10b, který je exprimován v kostní dřeni a pro tvorbu kosti je velice důležitý, nadměrná exprese Wnt10b v MSC má za následek zvýšenou hustotu kosti a zvýšenou genezi osteoblastů (Ding 2011). Mimo Wnt10b se na diferenciaci v osteoblasty podílí β -katenin, jehož zvýšená signalizace působí na Runx2, což je transkripční faktor spojený právě s diferenciací v osteoblasty. Snížená signalizace β -kateninu naopak indukuje chondrogenezi. Kostní morfogenetický protein (BMP) je skupinou různých růstových faktorů, které jsou součástí nadrodiny transformujícího růstového faktoru beta (TGF β). BMP spouštějí buněčné reakce skrze Smad dráhu, což je dráha, ve které povrchové receptory typu I a typu II

pomocí serin/treonin kinázové aktivity a intracelulárních Smad proteinů přenáší signály z povrchu buněk do jádra. BMP se účastní skeletogeneze a mají vliv na expresi osterix neboli transkripčních faktorů Sp7 a Runx2. Díky vlivu na tyto faktory jsou BMP silnými induktory diferenciaci mesenchymálních progenitorových buněk v osteoblasty, konkrétně se jedná o BMP-2, BMP-7, BMP-9. MSC reagují i na leptin, díky kterému dochází ke zvýšení jejich proliferace a diferenciaci na osteoblasty (Fakhry 2013, Hwang 2009).

3.4.3 Diferenciaci chondrocytů

Během diferenciaci MSC na chondrocyty dochází ke zvýšení množství genů specifických pro chrupavku, kolagen typu I a IX, který se podílí na pevnosti tvaru chrupavky. Zvyšuje se i biosyntéza kolagenu a proteoglykanů, které dodávají chrupavce odolnost proti stlačení. Proces chondrogenese vyžaduje přítomnost MSC, jejich migraci a proliferaci, je to proces řízený skrze buněčnou interakci s okolním matrix. Chondrogenese se účastní různé růstové faktory např. proteiny Wnt, BMP proteiny, hedgehog proteiny a členové nadrodiny růstových faktorů TGF- β , IGF a FGF. *In vitro* chondrogenní diferenciaci MSC dosahuje v trojrozměrném stavu v přítomnosti TGF- β faktorů, který má podíl na diferenciaci, regulace a účastní se syntézy extracelulárního matrix mezenchymálních kmenových buněk. TGF- β 1, β 2 a β 3 jsou vyloučeny v negativní formě a následně po oddělení od latentního peptidu jsou aktivovány, dále se váží na serin/treoninové kinázy receptorů typu I a II, čímž se aktivují proteiny R-Smad. Proteiny R-Smad se spojí s Co-Smad a vzniká aktivovaný komplex, který je přesunut do jádra, kde reguluje genovou expresi jako transkripční faktor.

Do TGF- β patří BMP což jsou homodimerní molekuly, které hrají velkou roli jak v chondrogenesi, tak osteogenesi. BMP-2 zvyšuje proliferaci a produkci EMC v chrupavce a zároveň snižuje expresi genů kolagenu typu I. BMP-4 je signální molekula účastnící se jak embryogeneze, osteogeneze, tak i chondrogenese, kde se podílí na urychlení diferenciaci chrupavky ve fázi zrání. BMP-7 známý také jako osteogenní protein 1 je syntetizován v chondrocytech, a naopak inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje chondrogenní diferenciaci. Na celkovém vývoji organismu se podílí i růstové diferenciacní faktory (GDF), což jsou proteiny patřící do rodiny TGF- β . V tkáňovém inženýrství chrupavky se nejvíce používá GDF-5, což je signální molekula, která má potenciál zvyšovat chondrogenní diferenciaci MSC a expresi transkripčního faktoru SoX9, který je důležitý pro diferenciaci a zraní chondrocytů (Hwang 2009, Danišovič 2012).



Obrázek 3: **Diferenciace mezenchymálních kmenových buněk** (upraveno dle, Almalki 2016).

3.5 Imunomodulace MSC

Lidské MSC prezentují nízkou hladinu histokompatibilního komplexu (MCH) I. třídy, nepodněčujících molekul jako je CD40 nebo CD80 a neexprimují MHC II. třídy. Tímto jsou MSC chráněny před aloreaktivní lýzou, která je způsobena přirozenými zabijáky (NK), což je frakce buněk imunitního systému. MSC se podílejí jak na imunitě vrozené, tak na imunitě adaptivní, mají imunomodulační funkci, která je zprostředkována především interakcí s imunitními buňkami jako jsou B-lymfocyty, T-lymfocyty, NK buňky, makrofágy či dendritické buňky (Séensebé 2010).

Mají schopnost zasahovat do buněčného cyklu a bránit odpovědi naivních a paměťových T buněk, indukovat funkci regulačních T buněk a inhibovat proliferaci a aktivaci efektorových T buněk. Imunosupresivní aktivita MSC vzniká jako reakce na zánětlivé signály iniciované látkami, jako je interleukin-1 (IL-1), TNF- α a interferon- γ (IF- γ). Tyto protizánětlivé molekuly podněčují MSC k sekreci rozpustných imunosupresivních molekul a inhibici povrchových koreceptory, jako je programovaný ligand smrti (PD-L1). Na diferenciaci MSC se skrze Toll-like receptory (TLR) a některé signální dráhy např. p38 mitogenem aktivovaná proteinová kináza (MAP), β -katenin či NF- κ B podílí i protizánětlivé signály, což indukuje

transkripci genů, které jsou specifické pro danou linii. Skrze vylučované rozpustné signály jako jsou prostaglandiny, chemokinové ligandy, růstové faktory, oxid dusný (NO) a interleukiny (IL) umožňují zánětlivé signály MSC řídit aktivitu některých vrozených a adaptivních buněk včetně makrofágů, neutrofilů a B-buněk. MSC brání kontaktu T buněk s buňkami prezentující antigen (APC), čímž zmírňují smíšené lymfocytární reakce. Imunosupresivní MSC prostřednictvím interleukinu 6 (IL-6) vychovávají makrofágy k proangiogennímu fenotypu M2, tyto makrofágy tak vychylují rovnováhu T-buněčných odpovědí ve prospěch imunitní regulace, tímto MSC významně přispívají k hojení tkání a regeneraci. Regenerační a imunologické vlastnosti MSC jsou hojně využívány v degenerativních situacích např. na zvířecích modelech infarktu myokardu zmírňují podané alogenní MSC fibrózu a jizvení komor (Shamma 2020). MSC kultivované *in vitro* se díky svým chemokinovým a toll-like receptorům vracejí do orgánů jako jsou kostní dřeň, játra nebo srdce ve kterých zůstávají po delší dobu, zároveň exprimují mnoho adhezních molekul, růstových faktorů a endopeptidáz, které jim usnadňují válcování endotelu a transmigraci do tkání (Song 2020).

4 Využití MSC ve veterinární medicíně koní

Ve veterinární medicíně koní se MSC používají primárně k léčbě muskuloskeletálních zranění. Potenciál MSC není jen v jejich schopnosti podporovat regeneraci poškozené tkáně, ale hlavně v předcházení vzniku patologických jizev, modulaci imunitní reakce a regulace zánětu. Vysoké pozitivní výsledky se vyskytují u léčby tendinitid, kdy cca 77–98 % dostihových koní podrobených léčbě se vrátilo k závodění s mírou opětovného vyskytnutí zranění nižší než 30 % (Barrachinna 2018). S pozitivními výsledky se lze setkat i u léčení osteoartrózy nebo kloubních patologií. U koní byly MSC izolovány z mnoha druhů tkání, např. z kostní dřeviny, periferní krve, tukové tkáně, synoviální membrány i tekutiny nebo amniotické membrány. Při terapii jsou MSC často kombinovány s dalšími přípravky či chirurgickými zákroky, zároveň se však před léčbou zvažuje mnoho zdrojů variability jako je zdroj kmenových buněk, transport, technika odběru nebo i velikost jehly. I přes několikanásobné úspěchy v terapii, je i tak skutečný terapeutický potenciál těchto buněk ne zcela jasný (Fraile 2023, Naem 2020).

Kromě léčby poruch pohybového aparátu se dnes klinické studie zaměřují i na léčbu neurologických poruch nebo poruchy reprodukce. I v nervové tkáni jsou kmenové buňky přítomny a jsou schopny se diferenciovat v buňky nervové. Tyto kmenové buňky odvozené od NSC lze využít pro reparaci poranění míchy prostřednictvím remyelinizace axonů. Vytvořená jizva endogenními NSC totiž omezuje další poškození tkáně a nervů a zároveň poskytuje úlevu od bolesti. U koní se setkáváme s mnoha neurologickými problémy, mezi ně patří třeba koňská myeloencefalopatie, kdy se jedná o degenerativní změny v míše a mozgovém kmeni nebo onemocnění motorického nervu koní či samotná porucha míchy (Gugjoo 2019). Bohužel v některých případech jsou výsledky studií nejednoznačné. Příkladem může být studie C. Villagrán a kol., jejímž cílem byla reparace transkenovaného nervu. Nejprve byla vyhodnocena schopnost MSC se diferenciovat na buňky, které jsou podobné buňkám Schwanovým. Za 7 dní se BM-MSK od tří koňských dárců diferenciovaly *in vitro* na buňky podobné Schwanovým. Tyto buňky byly transplantovány do fascie v okolí *ramus communicans* jedné přední končetiny tří zdravých koní po vyříznutí části nervu. Pahýly nervu byly histologicky vyšetřeny po 45 dnech a nevykazovaly známky regenerace nervu. Výsledky studie byly nejednoznačné, přičemž vliv mohly mít různé faktory, například chirurgická technika, způsob podání buněk nebo anatomická oblast poraněného nervu. K neúspěchu přispívá však i skutečnost, že přesný mechanismus funkce kmenových buněk není ještě zcela pochopen a je

třeba prozkoumat i způsoby jejich podání co se týče regenerace poškozených nervů (Villagrán 2016).

Z reprodukčních poruch se potenciál kmenových buněk testuje hlavně u endometriózy, což je onemocnění kdy se buňky endometria nachází i mimo děložní dutinu, například ve vejcovodech. Equinní MSC jsou domovem pro děložní nežlázoové i žlázoové tkáně, což vede ke zlepšení doplnění endometriálních buněk, při jejich nízké proliferaci během těhotenství a k imunomodulaci. MSC odvozené z amnionu mohou být potenciálními kandidáty pro doplnění endometria při selhání březosti díky své variabilní biologické odpovědi (Gugjoo 2019). T. Grady a kol. provedli studii zaměřenou na proveditelnosti intraovariální injekce MSC, kdy sledovali její účinnost na funkci vaječnicků u koní. Dvě klisny podstoupily intraovariální injekci autologních nebo alogenních MSC a aktivita jejich vaječnicků byla hodnocena po 32 dnech. U klisny, která dostala injekci autologních MSC byl počet folikulů dva týdny od druhé injekce vyšší než po celý rok. Stejně tak tomu bylo i u alogenní klisny. Po 16 týdnech byly klisnám odebrány vaječnický na vyšetření genomického a mitochondriálního chimérismu, oba výsledky byly negativní. V rámci studie byly MSC podány i dalším klisnám starším 20 let a pouze u jedné klisny došlo ke vzniku komplikace, kdy se vytvořil ovariální absces po podání MSC (Grady 2016).

Na terapii pohybového aparátu koní je kladen největší důraz a pozornost. Daleko více než například na choroby postihující např. respirační aparát. Samozřejmě se setkáváme i s pokusy léčení onemocnění respiračního aparátu jako je například dušnost. V praxi však léčba tohoto onemocnění pomocí kmenových buněk není využívána. Jedním z důvodů je i to, že onemocnění není infekční a bývá způsobeno prašným prostředím a špatným vzduchem. Často tedy postačí pouhá změna prostředí (Trunda 2023).

4.3 Izolace MSC u koní

I přes mnoho možností zdroje MSC u koní neexistuje však shoda ohledně nejlepšího zdroje MSC pro banku pro alogenní terapii. Studie D. Barberini a kol. se zajímala o srovnání a zhodnocení buněčné kultury a diferenciačního potenciálu mezi BM-MSK a AD-MSK (Barberini 2014).

BM-MSK byly odebrány aspirací kostní dřevě u 5 koní ve věku od 7 do 12 let. Zvířata byla utlumena sedací pomocí 10% intravenózního xylazin hydrochloridu a následně byl proveden lokální anestetický blok pomocí 2% lidokain-hydrochloridu. Odběr byl proveden v oblasti pátého sternu do dvou injekčních stříkaček s obsahem 2 ml heparinu a 2 ml Hanksova vyváženého solného roztoku. Roztok byl odstředěn a následně bylo přidáno médium DMEM

s nízkým obsahem glukózy. Směs se přidala k roztoku Histopaque a byla opět z centrifugována. Na závěr bylo opět přidáno médium DMEM a počet buněk byl stanoven pomocí Trypanové modře. Buňky byly následně kultivovány v hustotě 10×10^3 při 37°C . Kultivační médium se měnilo každé 3 dny, aby nedošlo k nárůstu konfluence buněk nad 80 % (Barberini 2014, Maia 2013).

AD-MSK byly odebrány v oblasti nad dorzálním gluteálním svalem u 5 koní ve věku 6 až 13 let. Tuková tkáň se v této oblasti odebírá z důvodu snadné přístupnosti a absenci velkých žil. Zvířata byla opět uspána pomocí 10% intravenózního xylazin hydrochloridu a lokálně pomocí 2% lidokain-hydrochloridu. Byl proveden zhruba 10 cm řez rovnoběžný s páteří a 15 cm řez pod ní, což umožnilo dobrou vizualizaci rozdílu mezi tukovou a svalovou tkání. Při převozu do laboratoře byl 1 g tukové tkáně uchován v roztoku HBSS, což je vyvážený solný roztok a byl k němu přidán 2% penicilin. V laboratoři byla následně provedena mechanická separace na 0,2 až 0,3 cm a umístěna do 0,04% roztoku kolagenázy typu 1. Roztok byl po 30 minutách přefiltrován a bylo přidáno médium DMEM s nízkým obsahem glukózy a roztok byl 2x odstředěn. Počet buněk byl počítán opět pomocí Trypanové modře a následovala kultivace buněk o hustotě 10×10^3 při 37°C . I zde se kultivační médium měnilo každé 3 dny, aby nedošlo k nárůstu konfluence buněk nad 80 % (Barberini 2014, Carvahlo 2009). Během 48 hodin bylo zpozorováno přilnutí BM-MSK k baňce, přičemž u AD-MSK to bylo zpozorováno již za 32 hodin. Průměrný růst do třetí pasáže buněk byl u BM-MSK cca 25 dní a u AD-MSK cca 15 dní. Buňky odebrané z kostní dřeni a tukové tkáně byly schopné se po 10 dnech diferencovat do osteogenní linie, po 8 dnech do adipogenní linie a po 21 dnech do chondrogenní linie. U žádných MSC nebyla zpozorována exprese MHC – II (Barberini 2014).

4.4 Kosterní systém koní

Kosterní systém u koní zahrnuje kosti končetin, lebku, páteř, žebra a hrudní kost, celkově se jedná o 205 kostí v celém těle koně: páteř, která má 54 kostí, kosti lebeční, 34; kosti žeberní, 36; kost hrudní, hrudní končetiny, 40 a pánevní končetiny, 40. Kostra chrání životně důležité orgány, udržuje tvar těla a podpírá měkké tkáně. Kostí dělíme na krátké, dlouhé, ploché, sezamské a členité. Krátké kosti tlumí otřes, jsou silné a robustní a patří k nim kosti karpu, zánártní kosti hlezna, kost korunková a zápěstní. Dlouhé kosti napomáhají především k pohybu a udržení hmotnosti, patří k nim např. třetí kost záprstní, stehenní kost, kost vřetení a loketní kost i kost pažní. Kostí ploché mají široký a plochý povrch, obklopují orgány a zároveň je chrání, svaly se pak upínají na jejich širokou plochu. Mezi tyto kosti řadíme žebra,

lebku a kost hrudní. Sezamské kosti se nacházejí v blízkosti šlach nebo vazů, příkladem může být kost kopytního kloubu na níž se upíná hluboký ohybač prstu nebo kosti spěnkového kloubu, které leží za kostmi spěnkového kloubu a podílejí se na správné funkci šlach a vazů. Členité kosti tvoří páteř, která chrání nervový systém.

Kosti v těle koně ukládají minerální látky jako je vápník a fosfor, zároveň jsou místem tvorby červených krvinek. U dospělého koně obsahují kosti zhruba 9 až 10 kg vápníku. Kost je po celé délce až na kloubní místa pokryta tuhou blánou neboli okosticí, která se podílí na ochraně kosti a v případě poranění je i místem hojení. Může docházet k exostóze, kterou vytváří kostní buňky osteocyty, dochází k vytváření dodatečného kostního materiálu, který stabilizuje kost při zánětu okostice nebo při vytvoření praskliny. Součástí kosterního systému je i kloub, což je spojení mezi dvěma kostmi, kompletní spojení je podpořeno sítí šlach, vazů a svalů. Kloub je obklopen fibrózním kloubním pouzdem, který je na vnější straně tvořen vazivem a na vnitřní straně je protkán nervy, cévami a mízními cévami. Klouby se rozdělují na chrupavčité, vazivové a synoviální. U chrupavčitých kloubů jsou kosti spojeny chrupavkou, patří sem třeba pánev. Vazivové neboli pevné klouby nemají žádnou dutinu a jejich pohyb je velmi omezený, najít je můžeme třeba na lebce. Synoviální klouby jsou plně pohyblivé a jsou přizpůsobivé otřesům a nárazům. Jsou tvořeny vazivovým pouzdem a synoviální tekutinou, která je produkována vazy a kloubní výstelkou. Hyalinní chrupavka, která se nachází na kloubních koncích kostí je pružná a stlačitelná, příkladem takového kloubu může být spěnkový kloub (Fritz 2012, Higginsová 2009).

4.5 Svalový systém

Svaly jsou tvořeny svalovými buňkami zvanými jako myocyty. Vlákna, která jsou tvořena myocyty, se spojují do snopců a snopečků. Tyto vlákna jsou obklopena pojivovou tkání neboli povázkou. Sval se natahuje a smršťuje díky malým vláčkům a myofibrilům, které se nachází uvnitř vlákna. V myofibrilech jsou buněčné membrány a sarkolema, které dohromady tvoří bílkovinné myofilamenty, tenké filamenty jsou aktinového původu a silné jsou původu myozinového. Filamenta aktinová a myozinová se při stahu svalu navzájem překrývají a při uvolnění se vrací do původní polohy.

Vlákna můžeme dělit na bílá neboli rychlá a červená neboli pomalá vlákna. Bílá vlákna jsou větší nežli červená, dokáží rychle vytvořit menší množství energie a snadno se unaví. Červená vlákna jsou schopna dlouhodobějších kontrakcí, výroba energie u těchto vláken vyžaduje přítomnost kyslíku a pomaleji se unavují. Svalovou tkáň dělíme na hladkou, srdeční a kosterní. Hladká svalová tkáň není ovladatelná vůlí a je součástí trávicí, kde zajišťuje

peristaltiku a ovlivňuje krevní tlak. Srdeční svalová tkáň je rovněž neovladatelná vůlí a nachází se pouze v srdci, nachází se zde interkalární disky čítzv. „mezerovitá spojení“, skrze které se přenáší nervové impulzy. Kosterní svalová tkáň stabilizuje a zpevňuje klouby, je vůlí ovladatelná a vytváří pohyb, zde je každá buňka v přímém kontaktu s nervovým vláknem.

Důležitou součástí je povázka, což je měkká tkáň, která obklopuje každou kost, sval i orgán. Je tvořena hustými kolagenními vlákny, díky tomu je pružná a pevná. Povázku dělíme na povrchovou a hlubokou, povrchovou povázkou prochází lymfa, krevní cévy a nervy. Odděluje svaly od kůže a může mít i funkci izolační vrstvy a zároveň chrání svaly před poškozením. Hluboká povázka je tlustá tkáň, která prostupuje svaly, vazy, kloubní pouzdra, okostici, krevní cévy, kosti a šlachy a zároveň je drží pospolu. Správně by měla být vlhká, volná a pohyblivá, a je tvořena několika vrstvami vazivové tkáně, které se překrývají (Fritz 2012, Higginsová 2009).

4.6 Šlachy a vazy

Šlacha je složena ze svazků hustých kolagenních vláken, které jsou uspořádané do dlouhých provazů. Upínají se na kosterní svalstvo ke kostem a podílejí se na pohybu, nejsou tak pružné jako svaly a mají vysokou tažnou sílu tudíž odolají velké zátěži. Na kost se upínají přes okostici, a to díky Sharpeyovým vláknům, které mají podobu malých trnů. Šlachy jsou obaleny ochranným šlachovým pouzdrém nebo tekutinou vyplněné váčky.

Vaz je svazek pojivové tkáně, která drží šlachy nebo kosti na svém místě. Spojují sousedící kosti a nejsou zdaleka tolik pružné jako šlachy. Pojivová tkáň vazů je tvořena hlavně bílkovinným kolagenem, podporují a ochraňují klouby. Vazy se dělí do čtyř typů, na vazy, které poskytují podporu, prstencový, který obepíná kloub dokola, mezikostní, který spojuje dvě kosti a provazcovitý, který pomáhá držet kosti u sebe (Fritz 2012, Higginsová 2009).

4.7 Poranění šlach

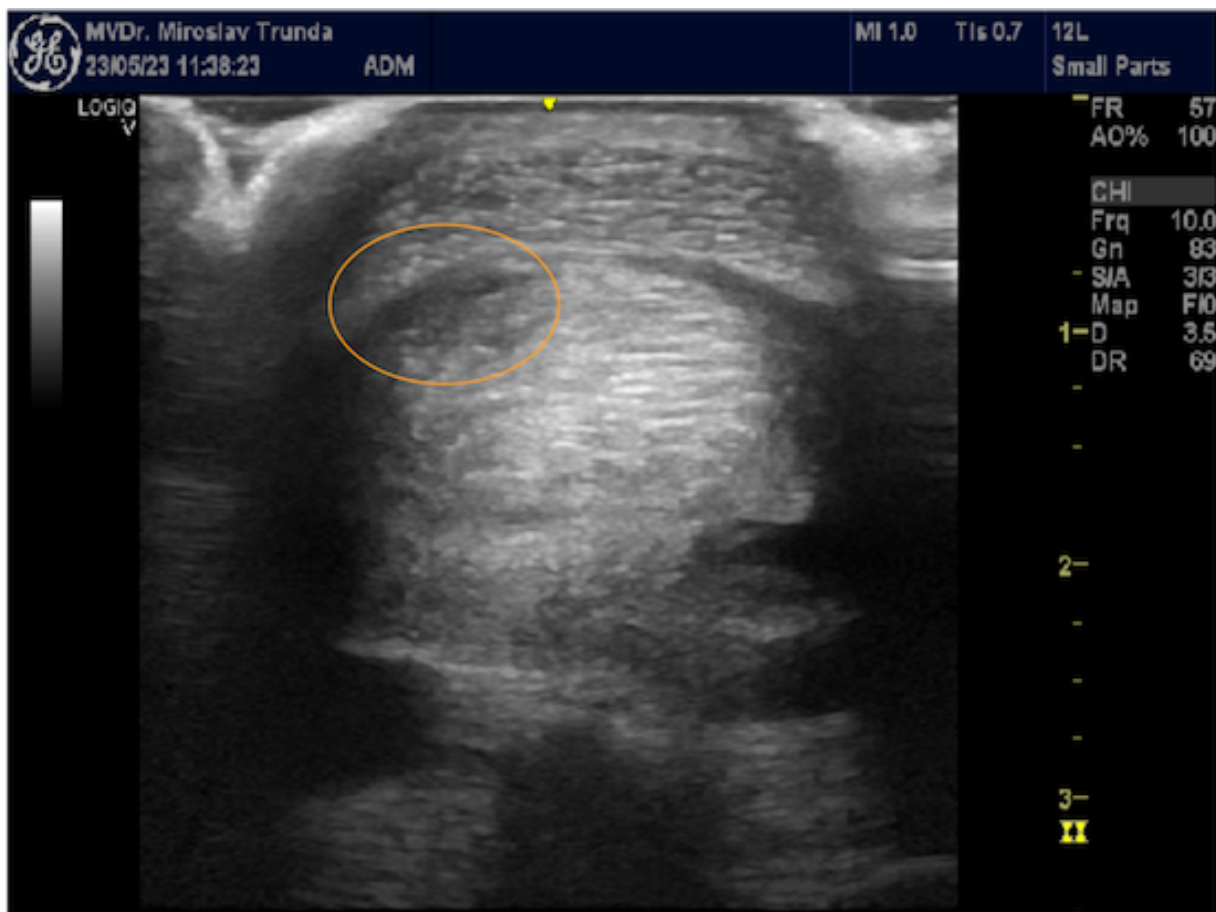
Poranění šlach je jedním z nejčastějších muskuloskeletálních problémů u sportovních koní. Povrchová šlacha digitálního ohybače (SDFT) je nejvíce ohrožena zraněním s výskytem tendinitidy neboli zánětem šlachy. Maximální napětí SDFT u koní je okolo 16 % což se blíží funkčnímu limitu, mimo zajištění pohybu slouží SDFT jako pružina, ve které se ukládá energie během klidu a během pohybu se uvolňuje, pro tuto správnou funkci SDFT je potřeba, aby její molekulární složení bylo neporušené. Hojení šlach se dělí do třech fází: po akutní zánětlivé fáze, která trvá několik dní hned po zranění, poté subakutní reparační fáze trvající 3–6 týdnů a následně chronická remodelační fáze, která může mít délku i 12 měsíců. Kvůli nízké rychlosti metabolismu šlachy, vaskularitě a buněčnosti šlachy je její regenerace pomalá a neefektivní,

zároveň je často doprovázena přetrvávajícím zánětem, který má za následek fibrovaskulární jizvu. Výsledná vytvořená fibrovaskulární jizva má neorganizovanou strukturu matrixu, zvýšenou produkci glykosaminoglykanů, proteoglykanů a kolagenu III, který zapříčiní, že šlacha není tak pružná jako před zraněním. Tyto biomolekulární změny ve šlaše vedou ke zhoršení jejich funkce a vzniku opětovného zranění.

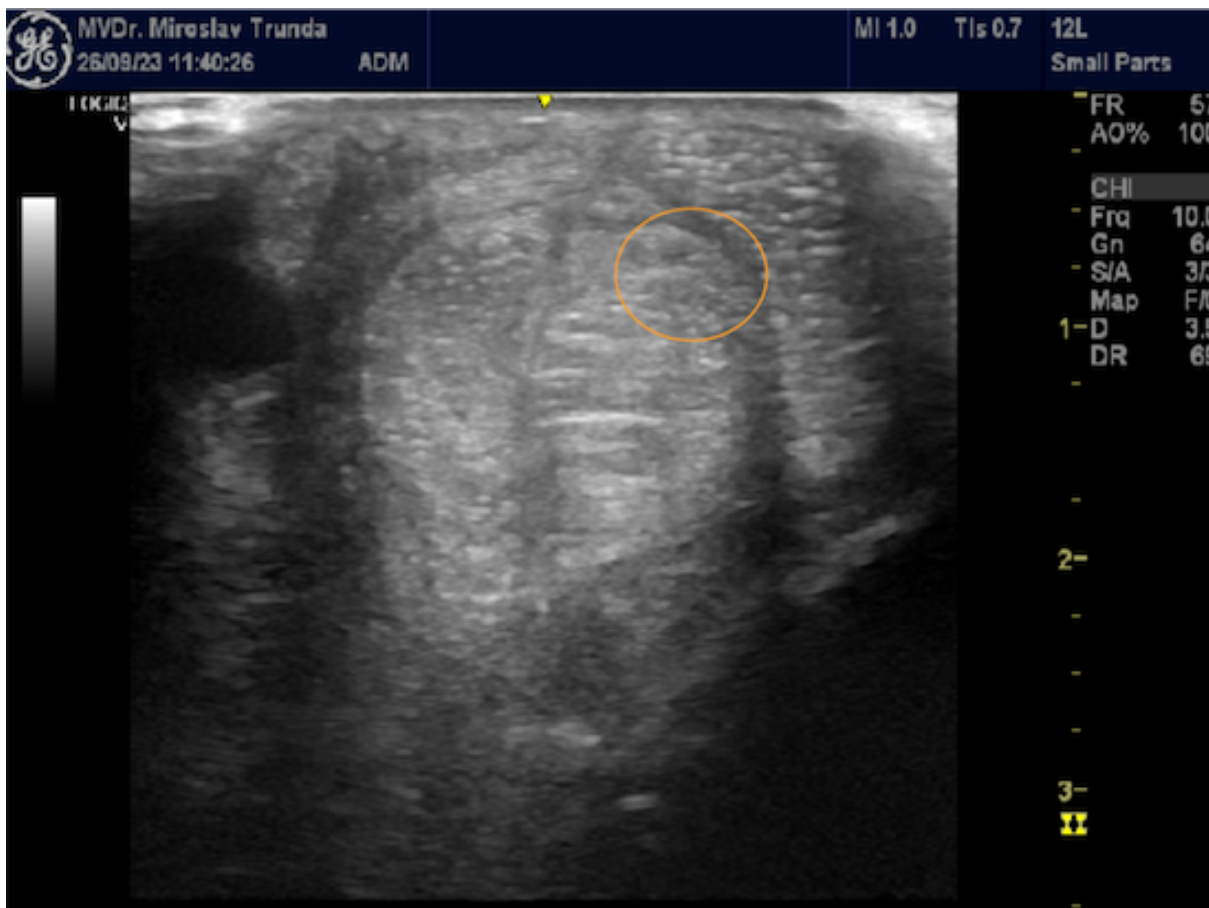
Terapie MSC snižuje míru opětovného zranění z 80 % na 13–36 % a zároveň dosahuje podrobnější reparace poškozené tkáně. MSC zapříčiní zvýšení výskytu protizánětlivých cytokinů, snížení prozánětlivých cytokinů a celkově snižují infiltraci imunitních buněk v místě poranění. Zároveň MSC inhibují dráhu TGF- β 1, která se podílí na rozvoji fibrózy, což je zmnožení vaziva jako důsledek hojení poškozené tkáně. Pro implantaci MSC do poškozené tkáně je potřeba expanze v laboratoři, dokud není k dispozici cca 10^7 buněk. Základem snížení opětovného zranění při terapii MSC je to, že se buňky po aplikaci diferencují v tenocyty, což jsou základní stavební buňky šlachy, a vytvoří se zde kolagen typu I, který byl ve šlaše původně. Šlacha je tudíž stejně pružná jako předtím a snese intenzivnější zátěž, než když by se vytvořil kolagen typu III, který se vytvoří při samovolném hojení poškozené šlachy (Trunda 2023). Bylo prokázáno, že terapie MSC spolu s IGF-1 měla lepší imunohistologické výsledky nežli terapie pouze samostatnými MSC, největší rozdíl byl hlavně ve zvýšené expresi genů kolagenu typu I. Pozitivní výsledky byly i prokázány při podání MSC izolovaných z kostní dřeně a suspendované ve fibrinogenu, alogenním séru či plazmatickém lyzátu. Při použití MSC izolovaných z tukové tkáně bylo prokázáno snížení zánětu, které bylo doprovázeno podélným uspořádáním kolagenových vláken a šlachových vláken. Při terapii MSC izolovaných z tukové tkáně se tyto buňky mohou kombinovat s plazmou bohatou na destičky (PRP), tato plazma je zdrojem různých biologických faktorů, které podporují buněčnou proliferaci, urychlují angiogenezi a regulují zánětlivé procesy. Značná heterogenita PRP však komplikuje hodnocení klinického využití a je potřeba pochopit jejich přesnou mechanizaci (Gugjoo 2019, Taylor 2007, Ribitsch 2021).

Při léčbě jádrových lézí by se měly MSC aplikovat přímo do jádra léze pod ultrazvukovým dohledem. Pro aplikaci se doporučuje jehla o průměru 20 až 23 G. Použití jehel o menším průměru snižuje vysoce životaschopnost BM-MS. Tento účinek je nejpravděpodobněji způsoben zvýšeným mechanickým stříhem buněk při zmenšení velikosti jehly (Schnabel 2013). Terapie šlach i vazů se ve veterinární medicíně koní ukázala jako velice účinná, ale je však potřeba dodržovat i poaplikační podmínky, které se týkají především pohybu koně.

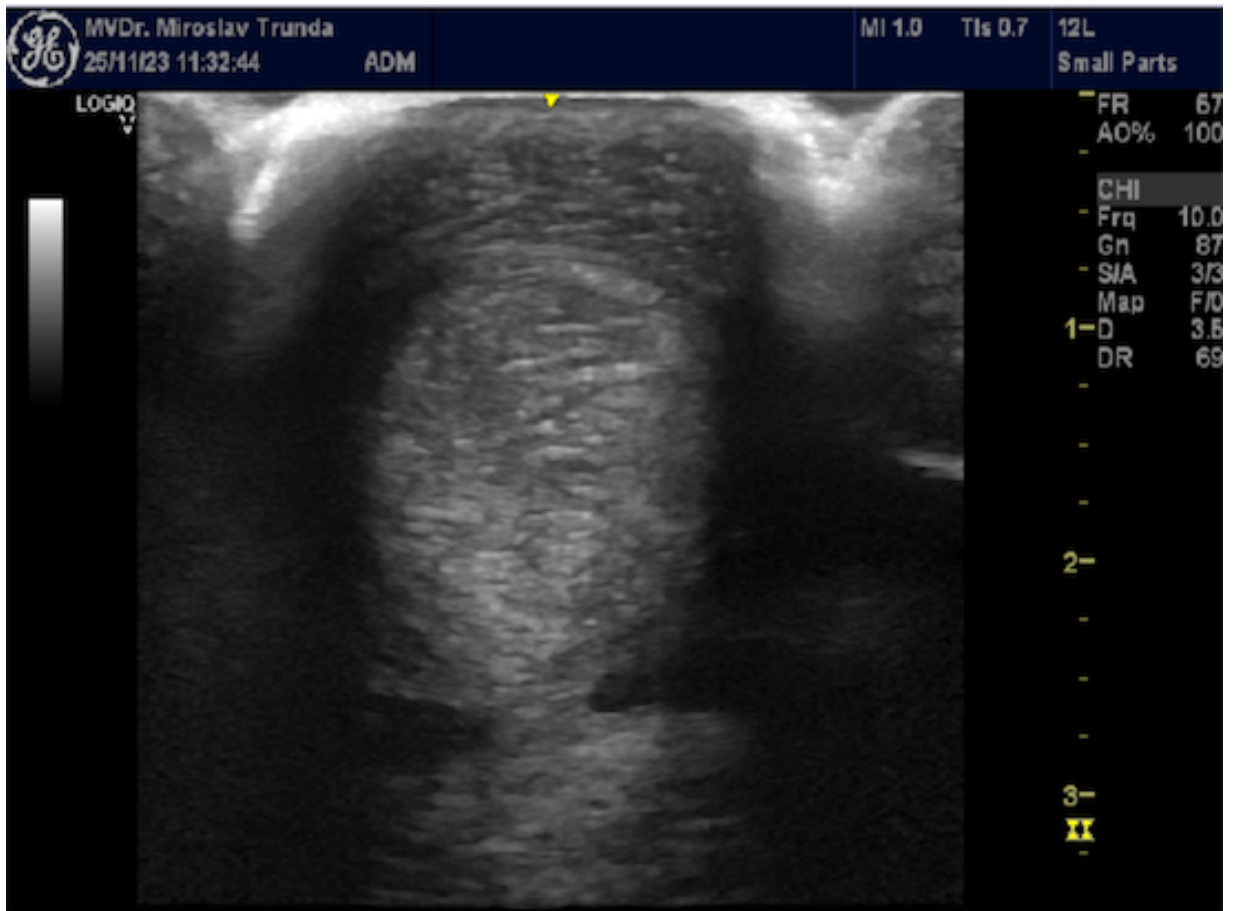
Na sonografických obrázcích je ukázána léze na šlaše u 19letého valacha, která byla léčena pomocí MSC. První sono bylo provedeno 23.5.2023 (obr. 4) a na něm je vidět, že léze se nacházela v hlubokém ohybači. Z kostní dřene byly odebrány kmenové buňky valacha a po 14denní kultivaci mu byly vpraveny do poškozeného místa. Před poddáním kmenových buněk bylo provedeno sono pro kontrolu, že během 14 nebyla vytvořena nová vlákna. Pokud by se nová vlákna již vytvořila, bylo by nemožné podat kmenové buňky, protože by nová vlákna byla poškozena vpíchnutím jehly. Jelikož se nová vlákna nestihla vytvořit byly kmenové buňky vpraveny do poškozené šlachy. Po vpíchnutí buněk byl kůň 3 dny v boxe, kvůli klidnému režimu, aby se buňky mohly uchytit a nohu měl zabalenou do gáze (obr.7). Následně pro podpoření zmírnění zánětu byla noha pravidelně chlazená pomocí ledové vody a chladicí hmoty tendilax. Pohyb koně byl omezen na 20 minut denně v kroku pouze po rovném, tvrdém asfaltu na vodítku. Po 7 až 14 dnech chlazení se noha balila do zábal, aby se vytvořilo podpůrné teplo pro činnost buněk a po 3 týdnech byla zvýšena chůze na 30 minut pod sedlem. Zároveň bylo potřeba nohu masírovat a jemně oddělovat jednotlivá vlákna šlachy. Dále bylo provedeno kontrolní sono 26.9. 2023 (obr. 5), kde je krásně vidět hojící se léze. Noha koně se stále balila do zábal a prostředkem října byl pohyb koně upraven. Po 20minutovém krokování se přidaly 4 minuty klusu a postupně se každý týden přidávalo cca po 2 minutách. 25.11.2023 bylo provedeno poslední kontrolní sono (obr. 6), na kterém je šlacha zcela zahojena. Po posledním sonu byl koni povolen i cval a postupnými dávkami se valach vrátil ke svému standardnímu pracovnímu režimu. Po roce od zranění šlachy nevykazuje valach známky opětovného poškození šlachy a má stejný sportovní režim jako měl před zraněním (Trunda 2023).



Obrázek 4: Sonografický obrázek poraněné šlachy (MVDr. Trunda, 2024).



Obrázek 5: Sonografický obrázek poraněné šlachy po podání MSC (MVDr. Trunda, 2024).



Obrázek 6: Sonografický obrázek zahojené šlachy (MVDr. Trunda, 2024).



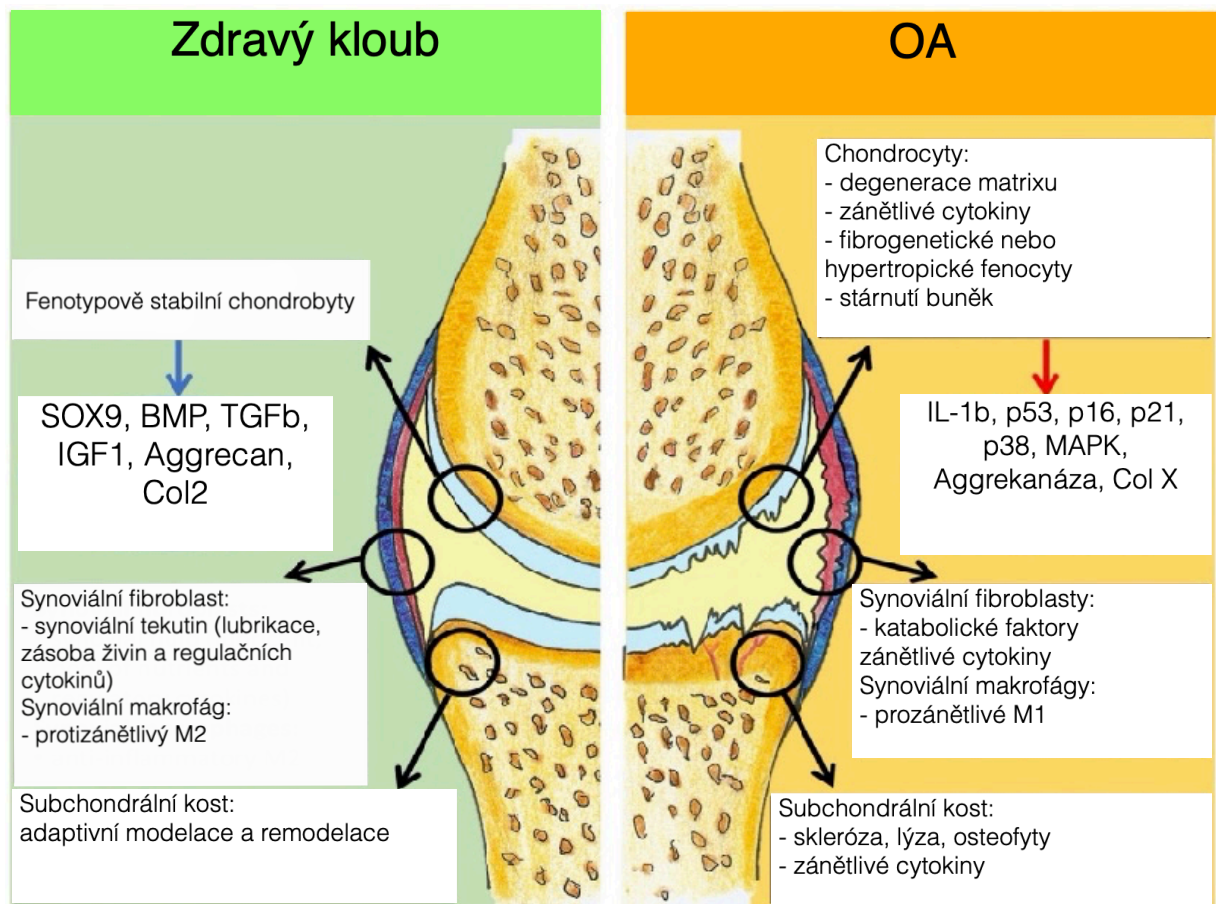
Obrázek 7: Ošetřená noha po podání MSC.

4.8 Poranění chrupavky

Chrupavka má omezené vlastní regenerační schopnosti z důvodu nepřítomnosti přímého lymfatického, krevního či nervového zásobení a přítomnosti malého počtu méně proliferativních chondrocytů. Spontánní hojení chrupavky většinou končí tvorbou fibrochrupavky. Fyziologické chondrocyty jsou plně diferenciované buňky, které se podílejí na udržení homeostázy a to tak, že syntetizují malé množství ECM čímž dochází k náhradě poškozených molekul ECM, tímto je pak udržena strukturální integrita matrixu chrupavky. V reakci na poranění procházejí chondrocyty fenotypovou změnou a stávají se aktivovanými,

jejich aktivace je charakterizována buněčnou proliferací, zvýšenou tvorbou extracelulárních proteinů matrixu, tvorbou shluků a zvýšenou tvorbou enzymů degradujících matrix. Patofyziologické děje ve chrupavce jsou poháněny hlavně časnou vrozenou imunitní odpovědí, které se podílí na katalyzaci regenerativních změn. Část vrozené imunity se připisuje synoviálním makrofágům a klíčovým efektorům synoviálního zánětu. Na patogenezi se významně podílí i chondrocyty a fibroblastům podobné synoviocyty. Produkty vyplavené během degenerace ECM chrupavky se uvolňují do synoviálního mikroprostředí čímž podněcují produkci proteolytických enzymů, protizánětlivých a katabolických mediátorů, tak se vytvoří začarovaný kruh, kdy dochází k rozpadu chrupavky a vzniká synoviální zánět.

S poškozením chrupavky se často setkáváme u osteoartritidy (OA), při kterém dochází k degeneraci kloubu (obr. 8), zánětu, stárnutím chrupavky a chondrocytů. Je to onemocnění, které postihuje celý kloub, tudíž jsou postiženy veškeré kloubní tkáně. Častou příčinou tohoto onemocnění může být defekt kloubu, která je vyvolána traumatem nebo autoimunitní reakcí. Mezi projevy OA patří degenerace chrupavky, fibrilace, mineralizace a úbytek kolagenu typu II a proteoglykanů, zároveň se zvyšuje syntetická aktivita chondrocytů, proliferace a může docházet i k apoptóze nebo synoviálnímu zánětu. Nejvýraznějším projevem OA je zvýšený fenotypový proliferatismus a značná heterogenita buněčných odpovědí a exprese genů, které vykazují osteoartritické chondrocyty (Gugjoo 2019, Barrachina 2018).



Obrázek 8: **Rozdíl mezi zdravým kloubem a poškozeným kloubem** (upraveno dle, Ribitsch 2021).

K léčbě defektu koňské chrupavky se v dnešní době hodně využívají techniky stimulace kostní dřeně a debridementu, při kterém dochází k odstranění poškozených a nefunkčních částí chrupavky a vaziva, poté se poškozené místo ošetří mikrorfrakturami. Obě tyto metody však nevedou k regeneraci kloubní chrupavky s rovnocennými biomechanickými vlastnosti jako mají původní tkáň. Hledají se proto nové techniky, pomocí kterých by se podařilo obnovit původní tvar a funkci chrupavky. Velký potenciál pro zlepšení funkce chrupavky, snížení bolesti a zmenšení velikosti léze chrupavky mají MSC. Modulují homeostázu kloubu a tím podporují regeneraci hyalinní chrupavky (Ribitsch 2021, Barrachinna 2018, Taylor 2007).

MSC na svém povrchu exprimují MHC-I, MHC-II nebo T-buněčné stimulační molekuly, exprimují i různé cytokiny jako je TSG-6, což je antagonist pro receptor protizánětlivého cytokininu IL-1 nebo IL-1Ra (protizánětlivý inhibitor matrixových metaloproteináz). Mezi produkované látky patří i TNF- α , INF- γ , PEG2 (prostagaldin) a IL-6. Podle některých studií může chrupavka vznikat rekapitulací procesů mesenchymální

kondenzace, kdy takto vylučovaná tkáň chrupavky se může podobat hyalinní tkáni jak vlastnostmi biochemickými, tak vlastnostmi fyziologickými. Příkladem mohou být diferenciované koňské BM-MSC na nichž jsou přítomny primární řasinky a dochází u nich k intenzivní syntetické a metabolické aktivitě, která je srovnatelná s fenotypem chondrocytů.

Většinou se v případech terapie chrupavek MSC u koní nejedná o komplexní regeneraci chrupavky, ale o klinické zlepšení na základě snížení klinických příznaků. Použití BM-MSC vede k lepším biochemickým i histologickým výsledkům při léčení OA na rozdíl od AD-SVF (*adipose diverted stromal vascular fraction*), při léčbě BM-MSC se snižuje hladina PEG2 v synoviální tekutině, která při použití AD-SVF je spolu s TNF- α zvýšená. V současnosti se doporučuje implantační dávka MSC v hyaluronových lešeních 2×10^7 . Klinické studie hodnotící použití BM-MSC při léčbě poškození menisku či chrupavek u 33 koní ukázalo, že 43 % koní se vrátilo na původní úroveň práce, 33 % se vrátilo k práci a pouhých 24 % se k práci nevrátilo. I přes to, že poškozená chrupavka má vzhledem k své poloze a vrozenému hojivému potenciálu se neustále zhoršovat, vykazují MSC lepší regeneraci než chirurgické zákroky. S použitím MSC jsou však spojeny různé obavy jako je integrace matrixu regenerované tkáně s nativní tkání chrupavky či absence typické regenerace hyalinní tkáně (Gugjoo 2019).

4.9 Laminitida

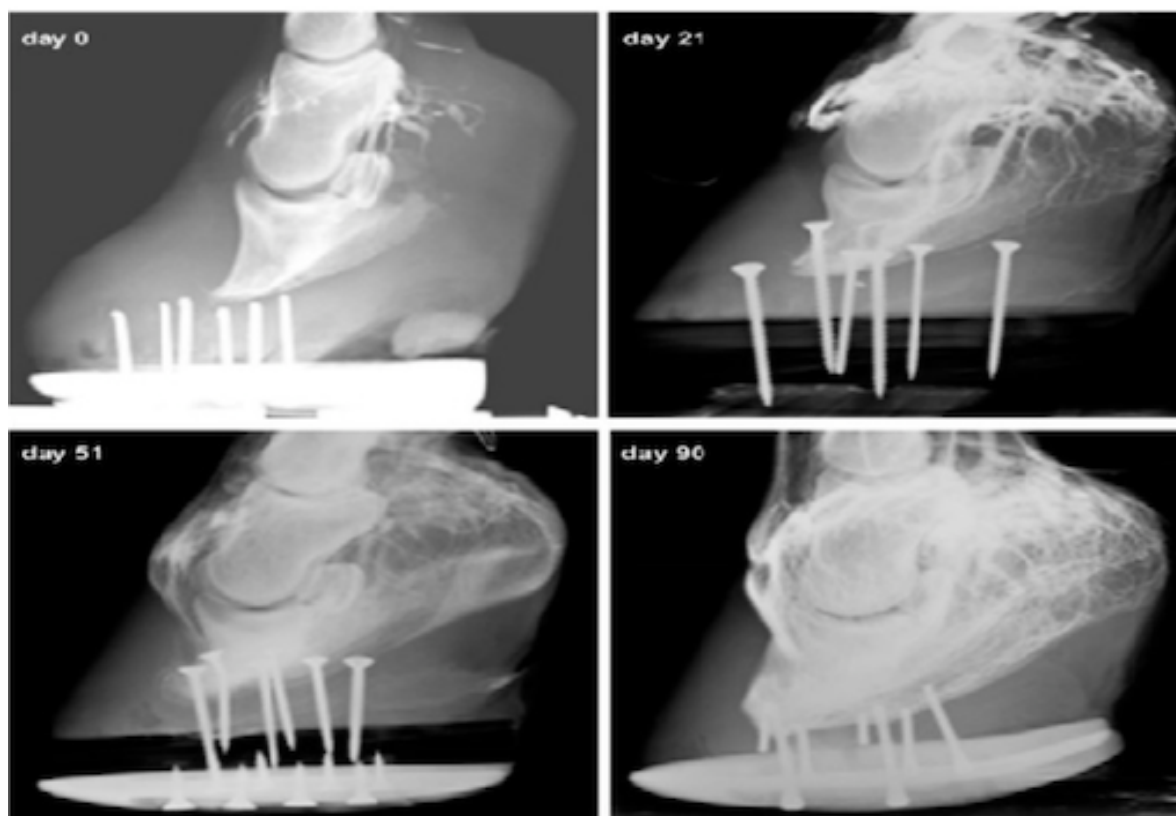
Laminitida neboli schvácenost kopyt je onemocnění, které je charakteristické zánětem a poruchou lamel, které se nacházejí ve vnitřku kopyta. Uvnitř kopytního pouzdra se nachází raková kost, která je obalena typem epiteliální tkáně tzv. korium. Tato epiteliální tkáň je zodpovědná za uložení kopyta a jeho připevnění. Laminární korium vychází z vnějšího povrchu rakové kosti a tvoří listům podobné lamely. Lamely rostou směrem ven a spojují se s vnitřními strukturami jako suchý zip. V kopytě nacházíme dermální a epidermální lamely. Dermální lamely mají rozsáhlou cévní síť v husté matrix pojivové tkáně, zatímco epidermální lamely jsou avaskulární a necitlivé. Při poškozené podpůrných lamel, zánětem dochází k hypoxii, kompresi cév a buněčné nekróze čímž se naruší křehký podpůrný mechanismus a oddělí se kosti od stěny kopyta. V některých případech může dojít i k proniknutí kosti skrze chodidlo kopyta nebo k úplnému oddělení kopyta a podkladové kosti (Angelone 2017, Ribitsch 2021).

Toto onemocnění může být důsledkem onemocnění primárního jako je zápal plic, břišní operace, onemocnění trávicího traktu či jiné, které způsobuje sepsi. V souvislosti s laminitidou se používá pojem „syndrom systémové zánětlivé odpovědi“, kdy vzniká laminitida jako odpověď na lokální zánět. K onemocnění může vést i inzulínová rezistence, kortikosteroidní dysmetabolismus nebo nadměrný příjem sacharidů (Angelone 2017).

Během laminitidy dochází ke snížení P63, což je determinant pro proliferaci epiteliálních kmenových buněk a snižují se i protizánětlivý interleukin IL-10. Naopak se zvyšují zánětlivé interleukiny jako je IL-1 β , IL-8 a IL-6, zároveň se zvyšuje i gama-histon H2AX protein, který se účastní vaskulárních zánětlivých reakcí (Yang 2019, Schnabel 2013, Carter 2011).

Ve studii Angeloneho a kol. bylo navrženo použití MSC k léčbě laminitidy na základě jejich schopnosti imunomodulace. Devíti koním byly podány suspendované aMSC (mezenchymové kmenové buňky z tukové tkáně) v PRP přes palmární žíly, u všech testovaných koní, které byly léčeny MSC/PRP bylo vidět zlepšení již po 6 měsících a mohli se navrátit ke své aktivitě. Dlouhodobé výsledky této konkrétní studie v souvislosti s laminitidou vykazovaly zlepšení veškerých klinických příznaků tohoto onemocnění jako je neochota k pohybu, zhoršený čtyřnohý postoj, vážnoucí digitální puls a nedošlo k recidivě laminitidy u 7 z 9 koní. U dvou koní k recidivě laminitidy došlo a musela být utracena (Angelone 2017, Ribitsch 2021).

Studii zabývajících se léčením laminitidy pomocí kmenových buněk není mnoho a některé se setkávají s neúspěchem. Problémem může být exprese MHC II, což je hlavní histokompatibilní komplex II. třídy, na povrchu MSC. Tento komplex naznačuje, že MSC v případě nevhodného genetického příjemce nedokážou podmínit imunitní odpověď. Nejlepší výsledky při léčbě laminitidy však poskytují a MSC podané v PRP, kdy dochází k celkovému zlepšení kvality kopyta koně. Na základě pozitivních výsledků klinických studií se zájem o léčbu tohoto onemocnění koní pomocí MSC zvyšuje (Schnabel 2013, Cequier 2021).



Obrázek 9: **Rentgenový snímek při léčbě laminitidy** – obrázky znázorňují postižení pravé nohy koně laminitidou v den 0, 21, 51 a 90. Koni byly podány aMSC/PPR již po 21 dnech je na snímku vidět zvýšení žilní náplně, po 91 dnech byla vaskularizace chodidla zcela obnovena (upraveno dle, Angelone 2017).

5 Využití MSC v medicíně lidí

Díky svým vlastnostem mají MSC obrovský potenciál nejen ve veterinární medicíně, ale i v buněčné terapii a regenerativní medicíně lidí. Buňky lze snadno izolovat z mnoha zdrojů jako je tuková tkáň, kostní dřev, menstruační krev, periferní krev atd. Jejich schopnost diferenciaci v různé druhy tkání, ve kterých se nachází, může být klíčem k léčbě mnoha onemocnění. V současnosti je na světě přes 650 klinických studií, které zkoumají potenciál MSC pro léčbu muskuloskeletálních, neurologických, ischemických i autoimunitních onemocnění. Příkladem může být studie, kterou napsal W. Chen a kol, která se zabývá léčbou primárního Sjögrenova syndromu (pSS) pomocí MSC. Jedná se o chronická systémové autoimunitní onemocnění během, kterého dochází k destrukci slzných a slinných žláz, ve kterých se tvoří lymfocytární infiltráty. U pacientů s pSS kmenové buňky potlačily autoimunitu, inaktivovaly prozánětlivé T-buňky a zlepšily sekreci slinné žlázy (Chen 2018, Choi 2019, Samsonraj 2017).

Především pomocí angiogeneze a imunomodulace prostřednictvím parakrinní sekrece bioaktivních faktorů opravují MSC ischemické tkáně. S terapií pomocí MSC u ischemických chorob se můžeme setkat například u kritické končetinové ischemie, což je nejnebezpečnější stádium onemocnění periferních tepen, při které je ohrožena životnost končetiny způsobená poklesem krevního toku a perfuzí tkáně. Při terapii tohoto onemocnění pomocí lidských autologních kmenových buněk, včetně BM-MSC, bylo zjištěno že kmenové buňky snižují velikost vředu, míru amputace končetiny, angiogenezi a perfuzí končetiny (Xie 2018, Choi 2019).

S léčbou poranění pohybového aparátu pomocí MSC se nesetkáváme pouze u koní, ale i u lidí. V rámci pohybového aparátu je kladen největší důraz na osteoartritidu, které postihuje hlavně starší jedince. Při OA dochází k opotřebením chrupavky, špatné reakci růstových faktorů a chondrocytů, vzniká mitochondriální dysfunkce, oxidativní stres a zánět. Během OA se v chrupavce nachází progenitorové buňky, které naznačují omezenou schopnost chrupavky se hojit. Terapie OA pomocí kmenových buněk je velice slibná, výsledky ukazují že po podání MSC dochází k velkému zmírnění bolesti a zlepšení kvality postižené chrupavky. V rámci terapie jsou důležité látky produkované MSC jako jsou růstové faktory, cytokiny nebo bioaktivní molekuly. Tyto látky mají protizánětlivé, apoptotické a angiopoetické účinky a díky nim je právě možné zaznamenat úlevu od bolesti. To naznačuje, že v budoucnosti by mohla být terapie založena na látkách, které kmenové buňky vylučují nikoli na buňkách samotných (Richardson 2016).

Populární jsou MSC i při léčbě neurologických onemocnění, které postihují struktury centrální nervové soustavy, jako je Alzheimerova choroba (AD), u níž infuze MSC zachraňuje paměťový deficit snížením ukládání amyloidu β ($A\beta$). $A\beta$ je složka senilních plaků a neurofibrilárních klubek, které jsou nacházeny v mozku pacienta s Alzheimerovou chorobou. Krom AD jsou pomocí MSC léčeny i jiná neurologická onemocnění jako je Huntingtonova choroba nebo Parkinsonova choroba. Zvláštní roli mohou MSC hrát i v nádorové terapii, jejíž progresi mohou ovlivňovat skrze vylučované faktory. Závisí zde na stavu receptorů, fosfatázy, tenzinového homologu (PTEN) nebo aktivaci Wnt, kdy následně může docházet z inhibici růstu a zvýšení buněčné smrti nebo může docházet ke zvýšenému růstu a metastázování. MSC v nádorové terapii tudíž hrají dvojí roli v závislosti na buněčném kontextu (Torsvik 2013, Anderzejewska 2021).

5.1 Autoimunitní onemocnění a léčba MSC

Autoimunitní onemocnění je jednou z deseti hlavních příčin úmrtí žen před 64 rokem života a ve Spojených státech jsou druhou nejčastější příčinou chronických onemocnění. Současná imunosupresivní léčba nevykazuje natolik pozitivní výsledky a často dochází i k nežádoucím účinkům. Zvyšuje se zájem o léčbu pomocí kmenových buněk, které díky vysokému proliferačnímu potenciálu a imunosupresivním vlastnostem jsou vhodnými kandidáty. Klinické studie se provádí například u Crohnovy choroby, primárního Sjögrenova syndromu nebo roztroušené sklerózy (Figueroa 2012).

5.1.1 Primární Sjögrenův syndrom

Primární Sjögrenův syndrom je chronické autoimunitní onemocnění postihující zhruba 0,05 – 1 % populace. Při tomto onemocnění se tvoří lymfocytární infiltráty ve slinných a slzných žlázách, což vede k jejich destrukci. Mezi nejčastější příznaky patří suchost v ústech neboli xerostomie, xeroftalmie či suchost očí a zubní kaz. Charakteristická je pro toto onemocnění vysoká aktivita B-lymfocytů a přibližně u 5–10 % pacientů se vyskytuje i non-Hodkingův lymfom, což je lymfom lymfatické tkáně a patří mezi jedny z nejzávažnějších komplikací Sjögrenova syndromu. Důležitou roli zde hraje jak adaptivní imunita, tak imunita vrozená. K aktivaci autoimunitních útoků na žlázové epitely a k aktivaci autoreaktivních imunitních buněk mohou vést spouštěcí faktory prostředí nebo defekty žláz. Poškozené žlázové epitely následně produkují prozánětlivé cytokiny a chemokiny, které zesilují autoimunitní reakce tím, že zvyšují přítomnost lymfocytárního infiltrátu ve žlázových tkáních. Tím, že při pSS dochází k nadměrné aktivaci B-lymfocytů, je tak podpořena tvorba velkého množství autoprotilátek. Autoprotilátky se dále mohou navázat na vlastní antigeny a s nimi vytvářet

imunitní komplexy, které se následně ukládají v orgánových systémech a poškozují příslušné tkáně (Wang 2021, Chen 2018).

S pSS jsou spojeny i buňky Th1, Th17, Tfh a tzv. Tregs, což jsou regulační T-lymfocyty, které jsou důležité pro regulaci autoimunitní odpovědi. Při tomto onemocnění je narušena supresní funkce Trgs, Imunoregulační aktivitou MSC, kretá je aktivovaná při řízená CD4 T buněk je snížena proliferace Th1, Th17, Tfh a zároveň dochází ke zvýšení Tregs. Předpokládá se, že zvýšení Tregs inhibuje zánět. Důležité při léčbě pSS pomocí BM-MSc je jejich schopnost diferenciacce na epiteliální buňky slinných žláz (SGEC). SGEC mají s BM-MSc srovnatelné buněčné struktury jako jsou těsné buněčné spoje nebo sekreční granula. Mimo to, že mají srovnatelné buněčné struktury se SGEC, exprimují při kultivaci BM-MSc slinné geny, například E-kadherin nebo α -amyláza a exprimují i různé proteiny mezi něž patří *high-mobility-group protein 20 B*, transkripční faktor E2a a *repeat-domain-containing-protein 56*. Díky tomu, že jsou BM-MSc schopny vytvářet acinární fenotyp slinných žláz jsou skvělými kandidáty pro léčbu onemocnění slinných žláz mezi něž patří právě pSS (Chen 2018, Xu 2012).

5.1.2 Crohnova choroba a léčba MSC

Crohnova choroba (CD) patří mezi chronické zánětlivé onemocnění střev při, kterém dochází ke změně imunitní odpovědi. Onemocnění nemá jistou příčinu, ale současné poznatky se přiklání k tomu, že se jedná o důsledek změny homeostázy imunitního systému střevní sliznice u geneticky predisponovaných jedinců. Na změně imunitního systému střevní sliznice se podílí hlavně porucha apoptózy T-lymfocytů a porucha epiteliální bariery. Výšené riziko vzniku Crohnovy choroby jsou převážně defekty genů, které souvisejí s autofagií. Autofagii provádí epitelové buňky a je to proces, při kterém dochází k odstranění nepotřebného cytoplazmatického materiálu a tím se snižuje šíření bakterií. Ke vzniku Crohnovy choroby mohou přispět i enviromentální faktory jako je kouření, anamnéza, expozice antibiotikům v dětství nebo i perorální antikoncepce (Ferré 2018).

Přesný mechanismus funkce MSC při léčbě tohoto onemocnění není zcela znám. V preklinických studiích však bylo prokázáno, že MSC inhibují T buňky zvýšením regulačních T buněk. To je zprostředkováno indukci indoleamin 2,3 dioxygenázy. Při zablokování indoleamin 2,3 dioxygenázy byl imunopresivní účinek T buněk zcela eliminován. V současnosti se léčba této choroby pomocí MSC zaměřuje spíše na hojení píštěl, což je abnormální kanálek vytvořený následkem Crohnovy choroby, který zprostředkovává komunikaci mezi dutinou a povrchem. Uvádí se, že MSC jsou úspěšné při hojení píštěle, však mechanismus tohoto hojení nebyl zcela objasněn. Všeobecně studie, které se problémem

Crohnovy choroby v souvislosti s MSC zabývají mají buď nedostatečně velké vzorky nebo se jedná o malé série případů. Jednou z klíčových studií, která se zabývala účinností MSC při hojení píštěl se jmenuje ADMIRE-CD (*Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Induction of Remission in Perianal Fistulizing Crohn's Disease/Tukem odvozené mezenchymální kmenové buňky pro navození remise u perianální fistulující Crohnovy choroby*) (Figueroa 2012, Carvello 2019).

5.1.3 Léčba roztroušené sklerózy pomocí MSC

Roztroušená skleróza (RS) je chronické onemocnění, které postihuje centrální nervový systém (CNS). Pro toto onemocnění je charakteristický zánět s demyelinizací, proliferací astroglíí a neurodegenerací. Vzniká migrací a proliferací patogenních T buněk do CNS, kde následně dochází k sekreci IL-1 β , IL-6, IL-7, TNF- α a INF- γ . Onemocnění může probíhat dvěma formami, a to buď jako progresivní nebo relabující. Častěji dochází k nástupu relabující formy onemocnění, což se projevuje epizodami neurologické dysfunkce, a to je následováno buď částečným nebo úplným návratem k původnímu fungování pacienta. Za nejčastější formu RS je považována relaps-remitentní RS, při níž dochází k částečnému zotavení mezi relapsy, později však dojde k nepřerušované progresi a v 80 % případů přechází relaps-remitentní RS na sekundárně progresivní RS. Roztroušená skleróza je onemocnění, kterým trpí přes 2,3 milionů lidí po celém světě, u relaps-remitentní RS jsou ženy postihovány 3x častěji než muži, a to již ve věku 30 let (Hauser 2020, Mansoor 2019).

Mezi klinické projevy RS patří zánět zřakového nervu, Uhthoffův fenomén, při kterém dochází k přechodnému kolísání či zhoršení příznaků RS, při zvýšení tělesné teploty a Lehrmittův fenomén, který je popisován jako pocit podobný elektrickému šoku dolů po páteři nebo končetinách při ohnutí krku. Léčba RS se v dnešní době zaměřuje hodně na snížení příznaků onemocnění a na akutní záchvaty (Hauser 2020, Doshi 2016). Pro diagnostiku a terapeutické sledování je klíčové MRI, pomocí kterého je možné sledovat signály ložisek, které jsou na obrazu bílé a nachází se převážně okolo mozkových komor. Mimo bílé signály se dají sledovat i tzv. černé díry nebo atrofie objemu mozku. Pro krácení doby relapsů se mohou používat kortikoidy nebo výměna plazmy. Obě možnosti však nemodifikují onemocnění, ale pouze zkracují dobu mezi jednotlivými relapsy. V léčbě RS však došlo k pokroku, když se začaly používat chorobou-modifikované léky jejichž cílem je zamezit vzniku relapsům, vzniku nových lézí nebo atrofie. Mezi chorobou-modifikované léky patří například β -interferon-1 α (*Rebif*), glatiramer acetát (*Copaxone*), dimethylfumarát (*Tecfidera*)

nebo teriflunomid (*Aubagio*). Všechny tyto léky byly schváleny Evropskou agenturou pro léčivé přípravky nebo americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Doshi 2016).

Kmenové buňky byly použity poprvé pro léčbu RS již v roce 1995, na léčbu byly použity HSC k prevenci chronické demyelinizace. I přes výhody HSC, jejich velkým problémem je v terapii toho onemocnění vznik sekundárního maligního onemocnění a trombocytopenie. Úspěšné jsou v léčbě MSC, které podporují remyelinizaci CNS a imunomodulaci, díky sekreci imunoregulačních faktorů, neuroprotektivním účinkům a jejich schopností nahrazovat poškozené buňky. MSC inhibují produkci prozánětlivých cytokinů, potlačují produkci T buněk, zároveň jsou schopné inhibovat dělení a produkci protilátek a působit na dendritické buňky a přirozené zabijáky, tím že potlačují jejich zrání a aktivaci. Kromě imunomodulačních schopností jsou MSC využívány díky své schopnosti diferenciaci. MSC se mohou diferencovat v astrocyty, oligodendrocyty a neurony. Podané MSC migrují do poškozené tkáně a nahrazují poškozené rezidentní buňky. Buňky MSC-NP jsou nervové progenitorové buňky odvozené od MSC vykazující charakteristiky neuroektodermální linie. Jejich transplantace u pacientů s RS zlepšuje svalovou sílu a funkci močového měchýře. Intratekální podání těchto buněk v chronické fázi vedlo k zvýšení myelinizace míchy a snížení imunitní infiltrace v CNS. Použití MSC-PN je pro léčbu RS velice slibné, ale je potřeba vyřešit optimální dávkování buněk. Klíčové pro léčbu MSC nejsou jen jejich protizánětlivé schopnosti, ale i jejich snadná izolace z tkání, ať už jsou buňky odebírány z tkáně tukové nebo kostní dřeně. V budoucnosti se zvažuje použití plátek produkovaných kmenovými buňkami jako jsou exozomy v kombinaci s protizánětlivými léky (Harris 2018, Mansoor 2019).

5.2 Neurologické onemocnění léčená pomocí MSC

Neurologické onemocnění jsou často různorodé a špatně pochopené, proto je léčba těchto onemocnění velice omezené. Kmenové buňky mohou být velkým příslibem pro zmírnění zátěže těchto poruch. Cílem těchto terapií by měla být lokalizace defektních částí mozku, obnova poškozených neuronů, snížit apoptózu a výskyt volných radikálů a zároveň regulovat zánět a podporovat synapsi z poškozených neuronů. Nejčastěji se setkáme se stuiemi, které se týkají onemocněních jako je Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza nebo Parkinsonova choroba (Alessandrini 2019, Joyce 2010).

5.2.1 Léčba Alzheimerovy choroby pomocí MSC

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které je jednou z nejčastějších příčin demence a vede ke ztrátě paměti a kognitivních funkcí. Pro toto onemocnění je charakteristické hromadění β amyloidních ($A\beta$) plaků a tvorba neurofibrilárních

spletenců což má za následek ztrátu cholinergních neuronů. Dalším rysem AD je přítomnost aktivovaných mikroglíí, které se nacházejí v těsném spojení s amyloidními plaky. Tyto aktivované mikroglie vylučují cytokiny jako je TNF- α , oxid dusnatý a IL-1 β , které podporují neurozáněť. V dnešní době se zkoumá řada strategií pro léčbu tohoto onemocnění, ale s úspěchem se setkává pouze zmírnění symptomů, proto se věnuje i větší pozornost tomu, jak onemocnění předejít (Passeri 2022, Weller 2018, Andrzejewska 2021, Duncan 2017).

Jednou ze zkoumaných možností léčby Alzheimerovy choroby jsou MSC, jejichž infuzí byly zlepšeny kognitivní funkce a snížením ukládání A β plaků byly zachráněny paměťové deficity. U potkanů, kterým byly podány MSC pro léčbu AD došlo ke zvýšení funkčnosti hipokampálních neuronů. Funkčnost těchto neuronů se zlepšila na základě zvýšení exprese cholin acetyltransferázy, acetylcholintransferázy a zvýšení hladiny acetylcholinu. MSC vykazují i ochrannou roli proti ztrátě synaptických proteinů, tím že obnovují hladiny synaptofyzinu, dekarboxylázy kyseliny glutamové a synaptoagminu-1. Existuje však málo důkazů o synaptickém zrání neuronů odvozených z MSC *in vivo*. Neuroreprodukce pomocí MSC je omezená z důvodu nízké schopnosti diferenciací neuronů a velkému sklonu k tvorbě gliových buněk. Větší význam v léčbě AD má tedy parakrinní účinek MSC, který se hlavně týká snížení A β plaků. Snižuje se i sekrece prozánětlivých cytokinů jako je TNF- α a IL-1 β , a zvyšuje se hladina interleukinu 10, což je neuroprotektivní cytokinin. MSC podané intravenózně jsou schopné překonat hematoencefalitickou bariéru bez vyvolání tumorigenní nebo imunitní odpovědi. (Andrzejewska 2021, Duncan 2017).

5.2.2 Huntingtonova choroba a léčba pomocí MSC

Huntingtonova choroba (HD) je onemocnění způsobené expanzí trinukleotidu CAG (cytosin-adenin-guamin) repetice v genu, který kóduje protein huntingtin. Hromadící se protein má cytotoxické účinky a dochází k odumírání neuronů zejména ve striatálních strukturách jako je kaudátní jádro nebo kůra vylučující γ -aminomáselnou kyselinu. V prvních fázích HD byla prokázána zvýšená hladina dopaminu, a naopak snížená hladina ve fázi pozdní. Příznaky HD se prvně projevují mezi 30–40 rokem života a jedná se o poruchu motoriky, chování a kognitivních schopností. Nejcharakterističtější jsou tzv. chorieformní pohyby, které jsou rychlé a krátké. Příkladem chorieformního pohybu může být vrtkavý pohyb prstů při chůzi. Následuje pak motorická impersistence, kdy pacienti nejsou schopni udržet svalovou kontrakci. Jedná se například o silný stisk ruky nebo udržení vyplazeného jazyka po dobu 10 sekund. S postupujícím onemocněním dochází k bradykinezi, což je celkové zpomalení pohybů

projevované často při chůzi a mimice. Následně pak dochází k dytonii, kdy se jedná o poruchu držení těla a jeho kroucení (Andrzejewska 2021, Wyant 2017, Stoker 2022, Kim 2021).

V dnešní době neexistuje lék, který by umožnil modifikaci onemocnění, veškeré terapeutické strategie se tedy zaměřují na zmírnění symptomů HD, tedy na zlepšení jak motorických, tak psychiatrických poruch a celkové zlepšení života pacienta. Současná farmakoterapeutická se zaměřují hlavně na snížení aktivace bazálních ganglií, která je zprostředkovaná nadměrně vylučovaným dopaminem v prvních fázích onemocnění. U pacientů trpících HD byla zaznamenána snížená hladina BDNF neboli mozkového neurotrofického faktoru. Neurotrofický faktor je protein zodpovědný za funkci a přežití kortikálních neuronů. Jeho obnova zvyšuje přežití neuronů a zmírňuje příznaky Huntingtonovy choroby. Kvůli krátkému poločasu rozpadu není účinná injekce samotného BDNF, proto bylo navrženo podání geneticky inženýrských MSC s vysokou expresí BDNF. U lidí transplantované MSC zapříčinily snížení atrofie ve striatu a stimulaci endogenní neurogeneze. Obecně transplantované MSC prodloužily životnost, tudíž na základě těchto výsledků může být terapie MSC aktivní pro pacienty s Huntingtonovou chorobou (Andrzejewska 2021, Kim 2021).

Závěr

Pro klinickou medicínu jsou kmenové buňky budoucností z pohledu možnosti léčby různých onemocnění, na která v současné době nezabírají aktuálně dostupné terapeutické přístupy. V těle kmenové buňky mají klíčovou a nepostradatelnou roli, protože jsou schopny regenerovat poškozenou tkáň, díky své schopnosti diferenciaci a proliferaci. Proces jejich diferenciaci končí vznikem specializované buňky dané tkáně, což může být klíčem k řešení různých degenerativních onemocnění. V mnoha klinických studiích se setkáváme s pozitivními účinky těchto buněk, i když se nejedná o kompletní vyléčení daného onemocnění. Často podání kmenových buněk dokáže zmírnit příznaky onemocnění a přispět k potlačení bolesti, a i to je velice důležité. Speciálně vlastnosti mezenchymálních kmenových buněk jsou využívány, a to jak v klasické medicíně, tak medicíně veterinární.

Mezenchymální kmenové buňky jsou používány hlavně k léčbě poruch pohybového aparátu u koní, mezi které patří tenditidy, tedy poruchy chrupavek jako je osteoartritida nebo laminitida. Experimentální studie prokazují, že právě díky léčbě mezenchymálními kmenovými buňkami se koně trpící některým z výše uvedených onemocnění mohou díky podání kmenových buněk vrátit ke každodennímu sportovnímu výkonu jako před zraněním. U lidí se využití mezenchymálních kmenových buněk nezaměřuje tolik na pohybový aparát, ale spíše na neurologické, autoimunitní nebo onkologické onemocnění. V mnoha klinických studiích u lidí se setkáváme s pozitivními účinky těchto buněk, jako je úleva od bolesti a mírnění příznaků daného onemocnění. Přestože mechanismus fungování těchto buněk není plně objasněn, posouvá se jejich zkoumání neustále dopředu v budoucnu budou jistě aktivní součástí léčby řady onemocnění ať už lidí nebo koní.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Agarwal G., Agiwal S., Srivastava A. Hyaluronic acid containing scaffolds ameliorate stem cell function for tissue repair and regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 165 s. 388-401, ISSN 1879-0003, DOI: 10.1016/j.ibiomac.2020.09.107.
2. Alessandrini M., Preynat-Seauve O., Briun de K., Pepper S. M., Stem cell therapy for neurological disorders. *SAJM*, 2019, vol. 109 (8) s. 71-78, ISSN 2078-5135
3. Almalki G.S., Agrawal D. K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 2016, vol. 92(1-2) s. 41-51, ISSN 1432-0436, DOI: 10.1016/j.diff.2016.02.005.
4. Andrzejewska A., Dabrowska S., Lukomska B., Janowski M. Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disorders. *Advanced Science*, 2021, vol. 8(7) s. 1-27, ISSN 2198-3844, DOI: 10.1002/advs.202002944.
5. Angelone M., Conti V., Biacca C., Battaglia B a kol.; The Contribution of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma to the Treatment of Chronic Equine Laminitis: A Proof of Concept. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18(10) s. 1-50, ISSN 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms18102122.
6. Baranovskii D. S., Klabukov D. I., Arguchinskaya V. N., Yakimova O. A a kol.; Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stem stromal cell-based therapies. *Stem Cell Investigation*, 2022, vol. 9(7) s. 1-12, ISSN 2313-0792, DOI: 10.21037/sci-2022-025
7. Barberini D. J., Freitas P. P. N., Magnoni S. M., Maia L a kol.; Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, 2014, vol. 5, 25, ISSN 1757-6512, DOI: 10.1186/scrt414
8. Barrachina L., Romeo A., Zaragoza P., Rodellar C a kol.; Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse. *The Veterinary Journal*, 2018, vol. 238, s. 49-57, ISSN 1532-2971, DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.07.004
9. Betts G. J., Young K. A., Wise J. A., Johnson E a kol.; Cellular Differentiation. *Pathology*, 2022.
10. Carter R. A., Engiles B. J., Megee S. O., Senoo M a kol.; Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitis equine hoof. *Equine Veterinary Journal*, 2011, vol. 43(5) s. 505-631, ISSN 2042-3306, DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00325.x.
11. Carvello M., Lightner A., Yamamoto T., Kotze G. P a kol.; Mesenchymal Stem Cells for Perianal Crohn's Disease. *Cells*, 2019, vol. 8(7), 764, ISSN 2073-4409, DOI: 10.3390/cells8070764.
12. Casado-Díaz A. Stem Cell in Regenerative Medicine. *Journal in Clinical Medicine*, 2022, vol. 11(18), 5460, ISSN 2077-0383, DOI: 10.3390/jcm11185460
13. Cequier A., Sanz C., Rodellar C., Barrachina L. The Usefulness of Mesenchymal Stem Cells beyond the Musculoskeletal System in Horse. *Animals*, 2021, vol. 11(4), 931, ISSN 2076-2615, DOI: 10.3390/ani11040931.
14. Carvalho M. de A., Alves G. L. A., Golim A. M., Moroz A a kol.; Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, vol. 132(2-4) s. 303-306, ISSN 1873-2534, DOI: 10.1016/j.vetimm.2009.06.014.

15. Čedíková M., Krakorová K., Miklíková M., Hroznová M a kol.; *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenačních postupů*, 2013 ISSN 1804-4409.
 Danišovič L., Varga I., Polák Š. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cell. *Tissue and cell*, 2012, vol. 44(2) s.69-73, ISSN 1532-3072, DOI: 10.1016/j.tice.2011.11.005.
16. Ding D., Shyu W., Lin S. Mesenchymal Stem Cell. *Cell Transplantation*, 2011, vol. 20(1) s. 5-14, ISSN 1555-3892, DOI: 10.3727/096368910X.
17. Doshi A., Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clinical Medicine*, 2016, vol. 16(6) s. 53-59, ISSN 1473-4893, DOI: 10.7861/clinmedicine.16-6-s53.
18. Duncan T., Velenzuela M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 2017, vol. 8(1), 111, ISSN 1757-6512, DOI: 10.1186/s13287-017-0567-5
19. Fakhry M., Hamade E., Bardan B., Buchet R a kol.; Molecular mechanism of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells*, 2013, vol. 5(4) s. 136-148, ISSN 1948-0210, DOI: 10.4252/wjsc.v5.i4.136.
20. Ferré B. P. M., Watts-Boscá M. M., Pérez M. M. Crohn's disease. *Medicina Clínica*, 2018, vol. 151(1) s. 26-33, ISSN 2387-0206, DOI: 10.1016/j.medcle.2018-05-006.
21. Figueroa E. F., Carrión F., Villanueva S., Khoury M. Mesenchymal Stem Cells treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biological Research*, 2012, vol. 45(3) s. 266-277, ISSN 0716-9760, DOI: 10.4067/S0716-97602012000300008.
22. Filip S., Mokřý J., Hruška I. *Kmenové Buňky*, 2006, s. 223, ISBN 80-7262-401-6
23. Fortier A. L., Travis A. J. Stem cell in veterinary medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 2011, vol. 2(9) s. 1-6, ISSN 1757-6512, DOI: 10.1186/srct.50.
24. Fraile P. A., González-Cubero E., Martínez-Flórez S., Olivera R. Ea kol.; Regenerative Medicine Applied to Musculoskeletal Disease in Equines: A Systematic Review. *Veterinary Science*, 2023, vol. 10(12), 666, ISSN 2306-7381, DOI: 10.3390/vetsci10120666.
25. Fritz Ch. *Základní Anatomie koní*, 2022, s. 97, ISBN 978-80-88452-09-6
26. Ghazimorad H. M., Khalafizadeh A., Babashan S. A critical review on induced totipotent stem cells: Type and methods. *Stem Cell Research*, 2022, vol. 63, 102857, ISSN 1876-7753, DOI: 10.1016/j.scr.2022.102857.
27. Grady S. T., Watts A. E., Hinrichs K. Effect of mesenchymal stem cells on equine ovarian follicular development. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2016, vol. 14 s. 51-52, ISSN 1542-7412, DOI: 10.1016/j.jevs.2016.04.018.
28. Gugjoo M. B., Fazili R. M., Gayas A. M., Ahmad A. R a kol.; Animal mesenchymal stem cell research in cartilage regenerative medicine – a review. *Veterinary Quarterly*, 2019, vol. 39(1) s. 95-120, ISSN 1875-5941, DOI: 10.1080/01652176.2019.1643051.
29. Gugjoo M. B., Fazili R. M., Gayas A. M., Ahmad A. R a kol. Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2019, vol. 72 s. 95-120, ISSN 1542-7412, DOI: 10.1080/01652176.2019.1643051.

30. Hamilton M., Harrington S., Dhar P., Stehno-Bttel L. Hyaluronic Acid Hydrogel Microspheres for Slow Release Stem Cell Delivery. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2021, vol. 7(8) s. 3754-3763, ISSN 2373-9878, DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c00658.
31. Harris K. V., Stark J., Vyshkina T., Blackshear L a kol.; Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *eBioMedicine*, 2018, vol 29 s. 23-30, ISSN 2352-3964, DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.02.002.
32. Hauser L. S., Cree B. A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *The America Journal of Medicine*, 2020, vol. 133(12) s. 1380-1390, ISSN 1555-7162, DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.05.049.
33. Hicks M. R., Pyle A. D. The emergence of the stem cell niche. *Cell Press*, 2022, vol. 2(33) s. 112-123, ISSN 0962-8924, DOI: 10.1016/j.tcb.2022.07.003
34. Higgsová G., Martinová S. Koně a jejich pohyb – Unikátní vizuální průvodce biomechanikou koňského těla, 2020, ISBN 978-80-7359-217-2
35. Hwang N., Zhang Ch., Hwang Y., Varghese S. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *WIREs MECHANISM OF DISEASE*, 2009, vol. 1(1) s. 97-106, ISSN 1939-5094, DOI: 10.1002/wsbm.26.
36. Chen W., Ye Y., Olsen N., Lin J a kol.; Mesenchymal Stem Cells in Primary Sjögren's Syndrome: Prospective and Challenges. *Stem Cells International*, 2018, vol. 2018(1) s. 1-11, ISSN 1687-9678, DOI: 10.1155/2018/4357865.
37. Chin H. M., Mason M. J., Xie W., Pelegri M a kol.; Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Press*, 2009, vol. 1(5) s. 111-123, ISSN 0962-8924, DOI: 10.1016/j.stem.2009.06.008
38. Choi R. J., Yong W. K., Nam H. Y. Current Status and Prespective of Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2019, vol. 2019, 476234 s. 1-3, ISSN 1687-9678, DOI: 10.1155/2019/4762634.
39. Ilic D., Polak J. M. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *British Medical Bulletin*, 2011, vol. 98(1) s. 117-126, ISSN 1471-8391, DOI: 10.1093./bmb/ldr012.
40. Joyce N., Annett G., Wirthlin L., Olson S a kol.; Mesenchymal stem cells for treatment of neurodegenerative disease. *Regenerative Medicine*, 2010, vol. 5(6) s. 933-946, DOI:10.2217/rme.10.72.
41. Kalra K., Tomar P. C. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2014, vol. 2(7) s. 919-930, ISSN 2321-2748.
42. Karmini M., Bahrami S., Mirshekari H., Basri M. M. S a kol.; Microfluidic systém for stem cell-based neural tissue engineering. *Lab on a Chip*, 2016, vol. 16(14) s. 2551-2571, ISSN 1473-0189, DOI: 10.1039/C6L00489J.
43. Kim A., Lalode K., Truesdell A., Welter G. P a kol.; New Avenues for the Treatment of Huntington's disease. *International Journal of Molecular Science*, 2021, vol. 22(16), 8363, ISSN 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms22168363.
44. Knight E., Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro*. *Journal of Anatomy*, 2014, vol. 227 s. 746-756, ISSN 1469-7580, DOI: 10.1111/joa.12257.
45. Kolios G., Moodley Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 2012, vol. 85(1) s. 3-10, ISSN 1423-0356, DOI: 10.1159/00345615.

46. Kong J., Dyck H., Soon Z. *Pathology: From the Tissue Level to Clinical Manifestations and Inter-professional Care*. British Columbia: The University of British Columbia. c2022, s. 1355 License Type: Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY – NC 4.0)
47. Lakshmipathy U., Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood reviews*, 2005, vol. 1(19) s. 29-38, ISSN 1532-1681, DOI: 10.1016/j.blre.2004.03.001.
48. López-Ruis E., Jimenéz G., Antich C., Sabata R a kol.; Advances of Hyaluronic Acid in Stem Cell Therapy and Tissue Engineering, Including Current Clinical Trials. *Cells & Materials*, 2019, vol. 13 s. 186-213, ISSN 1473-2262, DOI: 10.22203/eCM.v037a12
49. Lyons G. F., Al-Munajjed A. A., Kieran M. S., Toner E. M a kol.; The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compered to stem cell-seeded tissue engineering constructs. *Biomaterials*, 2010, vol. 31(35) s. 9232-9243, ISSN 1878-5905, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.08.056.
50. Ma S., Xie N a kol.; Immunobiology of mesenchymal stem cell. *Cell Death & Differentiation*, 2014, vol. 21 s. 216-225, ISSN 1476-5403, DOI: 10.1038/cdd.2013.158.
51. Maia L., Landim-Alvarenga C. F., Silveria Da Mota L. S. L., Vita B a kol.; Immunophenotypic, Immunocytochemistry, Ultrastructural, and Cytogeni Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Equine Bone Marrow. *Microscopy research & Technique*, 2013, vol. 76 s. 618-624, ISSN 1097-0029, DOI: 10.1002/jemt.22208.
52. Mandl Ch. M., Heilshorn C. S. Engeneering Hydrogel Microenviroments Recapitulate the Stem Cell Niche. *Annual Reviws*, 2018, vol. 1(20) s. 21-47, ISSN 15239829, DOI: 10.1146/annurev-bioeng-062117-120954.
53. Mansoor R.S., Zabihi E., Ghasemi-Kasman M. The potential use of mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis. *Life Science*, 2019, vol. 235, 116830, ISSN 1879-0631, DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116830.
54. McKee CH., Chaudhry R. G. Advances and challanges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Bionterfaces*, 2017, vol. 159 s. 62-77, ISSN 1873-4367, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.
55. Mirzaei H., Sahebkar A., Sichani S. L., Moridikia A a kol.; Therapeutic application of multipotent stem cells. *Journal of Celular Physiology*, 2017, vol. 4(233), ISSN 1097-4652, DOI: 10.1002/jcp.25990.
56. Ulloa-Montoya F., Verffalie M. C., Hu W. Culture systems for pluripotent stem cells. *Jurnal of bioscience aand bioengineering*, 2005, vol. 1(100) s. 12-27, ISSN 1347-4421, DOI: 10.1263/jbb.100.12.
57. Motta L. C. B., Pereira M. V., Pinto F. A. P., Pieri G. C. N a kol.; 3 D culture of mesenchymal stem cells from the yolk sac to generate intestinal organoid. *Theriogenology*, 2023, vol. 209 s. 98-106, ISSN 1879-3231, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.06.003.
58. Naem al M., Bourebaba L., Kucharczyk K., Röcken M a kol.; Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders. *Stem Cell Review and Reports*, 2020, vol. 16 s. 301-322, DOI: 10.1007/s12015-019-09932-0.
59. Ottoboni L., Wunster B., Martino G. Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells. *Frontiers*, 2020, vol. 11, 148, ISSN 1664-2295, DOI: 10.3389/fneur.2020.00148.

60. Paim Á., Tessaro I. C., Cardozo M. S. N., Pranke P. Mesenchymal stem cell cultivation in electrospun scaffolds: mechanistic modeling or tissue engineering. *Journal of Biological Physics*, 2018, vol. 44 s. 245-271, ISSN 1573-0689, DOI: 10.1007/s10867-018-9482-y.
61. Pangjantuk A., Kaokaen P., Kunhorm P., Chiacharoenuomrung N a kol.; 3 D culture of alginate-hyaluronic acid hydrogel supports the stemness of human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 2024, vol. 14(4436), 4436, ISSN 2045-2322, DOI: 10.1038/s415998-024-54912-1.
62. Passeri E., Elkhoury K., Morsink M., Broersen K a kol.; Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *International Journal of Molecular Science*, 2022, vol. 23(22), 13954, ISSN 1422-0067, DOI: 10.3390/ijms.232213954.
63. Rajabzadeh N., Fathi E., Farahzadi R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Investigation*, 2019, vol. 6 s. 1-11, ISSN 2313-0792, DOI: 10.21037/sci.2019.06.04.
64. Ribitsch I., Oreff L. G., Jenner F. Regenerative Medicine for Equine Musculoskeletal Disease. *Animals*, 2021, vol. 11(1), 234, ISSN 2076-2615, DOI: 10.3390/ani11010234.
65. Richardson M. S., Kalamegam G., Pushparaj N. P., Matta C a kol.; Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods*, 2016, vol. 99 s. 66-80, ISSN 1095-9130, DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.09.015.
66. Samsonraj M. R., Raghunath M., Nurcombe V., Hui J a kol.; Concise Review: Multifaced Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 2017, vol. 6(12) s. 2173-2185, ISSN 2157-6580, DOI: 10.1002/sctm.17-0129.
67. Sekula M., E. K. Zeba-Surma. *Biomaterials in Regenerative Medicine.*, InTech, c2018, s. 448, ISBN 978-953-51-3777-1
68. Sensebé L., Krampera M., Schrezenmeier H., Bourin P a kol.; Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sanguinis*, 2010, vol. 98(2) s. 93-181, ISSN 1423-0410, DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01227.x.
69. Shamma R., El-Hakim El-Kadiry A., Abusarah J., Rafei M. Mesenchymal Stem Cell Beyond Regenerative Medicine. *Frontiers*, 2020, vol. 8(72) s. 1-17, ISSN 1664-3224, DOI: 10.3389/fcell.2020.00072.
70. Schnabel L. V., Fortier A. L., McIlwraith W. C., Nobert M. K. Therapeutic use of stem cell in horses: Wich type, how, and when? *The Veterinary Journal*, 2013, vol. 197(13) s. 570-577, ISSN 1532-2971, DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.04.018.
71. Smetana K. Kmenové buňky. *Kontakt*, 2010, vol. 12(3) s. 251-254, ISSN 1804-7122
72. Sobhani A., Khanlarkhani N., Baazm M., Mohammadzadech F a kol.; Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*, 2017, vol. 55(1) s. 6-23, ISSN 1735-9694
73. Soliman A. M., Aboharb F., Zeltner N., Studer L. Pluripotent stem cells in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 2017, vol. 22(9) s. 1241-1249, ISSN 1476-5578, DOI: 10.1038/mp.2017.40.
74. Song N., Scholtemeijer M., Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanism and Therapeutic Potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2020, vol. 41(9) s. 653-664, ISSN 1873-3735, 10.1016/j.tips.2020.06.009.
75. Stagg J. Mesenchymal Stem Cell in Cancer. *Stem Cell Review and Reports*, 2008, vol. 4 s. 119-124, ISSN 2629-3277, DOI: 10.1007/s12015-008-9030-4.

76. Stoker B. T., Mason S. L., Greenland C. J., Holden T. S a kol.; Huntington's disease: diagnosis and management. *Practical Neurology*, 2022, vol. 22(1) s. 1-11, ISSN 1474-7766, DOI: 10.1136/paractneurol-2021-003074.
77. Taylor S.E., Smith R. K. W., Clegg P. D. Mesenchymal tem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Veterinary Journal*, 2007, vol. 39(2), ISSN 2042-3306, DOI: 10.2746/042516407X180868.
78. Tian Z., Yu T., Liu J., Wang T a kol.; Chapter One – Introduction to stem cells. *Progress in Molecular Biology nd Translation Science*, 2023, vol. 199 s. 3-32, ISSN 1877-1173, DOI: 10.1016/bs.pmbs.2023.02.012.
79. Torsvik A., Bjerkvig R. Mesenchymal stem cells signaling in cancer progression. *Cancer Treatment Reviews*, 2013, vol. 39(2) s. 180-188, ISSN 1532-1967, DOI: 10.1016/j.ctrv.2012.03.005.
80. Trunda M. MVDr., veterinář [ústní sdělení]. Praha, 15.8.2023
81. Villagrán C. C., Schumacher J., Donnell R. A ovel Model for Acute Peripheral Nerve Injury in the Horse and Evaluation of the Effect of Mesenchymal Stromal Cells Applied *In Situ* on Nerve Regeneraton: A Preliminary Study. *Frontiers in Veterinary Science*, 2016, vol. 3 s. 1-8, ISSN 2297-1769, DOI: 10.3389/fvets.2016.00080.
82. Wang B., Chen S., Li Y., Xuan J a kol.; Targeted Therapy for Primary Sjögren's Syndrome: Where are We Now?. *BioDrugs*, 2021, vol. 35 s. 593-610, ISSN 1179-190X, DOI: 10.1007/s40259-021-00505-7.
83. Wang Y., Fang J., Liu B., Shao Ch a kol.; Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. *Cell Stem Cell*, 2022, vol. 29(11) s. 1515-1530, ISSN 1875-9777, DOI: 10.1016/j.stem.2022.10.001.
84. Weller J., Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, 2018, vol. 1, DOI: 10.12688/f1000research.14506.1
85. Wyant J. K., Ridder A. J., Dayalu P. Huntingtin's Disease-Update on Treatments. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2017, vol. 17(4), ISSN 1534-6293, DOI: 10.1007/s1190-017-0739-P
86. Xie B., Luo H., Zhang Y., Wang Q a kol.; Autologou Stem Cells Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Stem Cells International*, 2018, vol. 2018 s. 1-12, ISSN 1687-9678, DOI: 10.1155/2018/7528464.
87. Xu J., Wang D., Liu D., Zhang H a kol.; Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome. *Blood*, 2012, vol. 120(15) s. 3142-3151, ISSN 1528-0020, DOI: 10.1182/blood-2011-11-391144.
88. Yang Q., Lopez M. The Equine Hoof: Laminitis, Progenitor (Stem) Cells, and Therapy Development. *Toxicologic Pathology*, 2019, vol. 49(7) s. 1294-1307, ISSN 1533-1601, DOI: 10.1177/0192623319880469.
89. Ylostalo J. H. 3 D Stem Cell Culture. *Cells*, 2020, vol. 9(10), 2178, ISSN 2073-4409, DOI: 10.3390/cells910178.
90. Zakrzewski W., Dobrzyński M., Szyonowicz M., Rybak Z. Stem cell: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, vol. 10(1), 68, ISSN 1757-6512, DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5.