

EXTRABUNKOVÉ VEZIKULY – EXOZÓMY MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH/STROMÁLNYCH BUNIEK AKO INOVATÍVNA BEZBUNKOVÁ REGENERAČNÁ TERAPIA

Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles – exosomes as an innovative cell-free regenerative therapy

Čestmír ALTANER^{1,2}, Uršula ALTANEROVÁ¹, Jana JAKUBECHOVÁ^{1,2}, Peter ŠVEC^{1,3}, Juraj KAUSITZ¹

¹Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava, riaditeľ doc. MUDr. J. Kaušitz, CSc.

²Ústav experimentálnej onkológie, BMC SAV Bratislava, riaditeľ Mgr. M. Chovanec, PhD.

³Transplantačná jednotka kostnej drene Národného ústavu detských chorôb v Bratislave, primár MUDr. P. Švec, PhD.

Abstrakt

Výskum mezenchýmových kmeňových/stromálnych buniek (MSCs) a ich sekretómu v posledných desiatich rokoch viedol k všeobecnému záveru, že MSC-sekretóm má špecifický regeneračný účinok. V závislosti od druhu buniek, z ktorých sekretóm pochádza, obsahuje extrabunkové vezikuly – exozómy a paletu cytokínov, chemokínov, rastových faktorov a iných biologicky aktívnych látok. V prehľadovom článku sa snažíme poukázať na imunoregulačné a hojivé mechanizmy indukované MSC-exozómami vedúcimi k regenerácii tkanív pri jednotlivých ochoreniach. Početné klinické štúdie naznačujú, že extrabunkové vezikuly vylučované mezenchýmovými stromálnymi bunkami pomáhajú pri terapeutickom riešení ochorení, ktoré doteraz nemajú dostatočne účinnú štandardnú liečbu. Napriek mnohým celosvetovým štúdiám je klinická regeneračná liečba stále v experimentálnom štádiu. Príčina je v komplexnosti samotného problému, finančnej náročnosti, vo veľkej heterogenite realizovaných štúdií a v regulačných pravidlách, ktoré sa v jednotlivých krajinách extrémne líšia (obr. 1, lit. 54). Text v PDF www.lekarsky.herba.sk.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: mezenchýmové kmeňové/stromálne bunky, extrabunkové vezikuly – exozómy, regeneračná medicína, autoimunitné ochorenia, hojenie rán, omladzovanie, nádorový tropizmus, klinické využitie.
Lek Obz 2023, 72 (5): 196-204

Abstract

Research on mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) and their secretome in the last ten years has led to the general conclusion that the MSC-secretome has a specific regenerative effect. Depending on the type of cells from which the secretome originates, it contains extracellular vesicles – exosomes and a range of cytokines, chemokines, growth factors and other biologically active substances. In the review article, we try to point out the immunoregulatory and healing mechanisms induced by MSC-exosomes, leading to tissue regeneration in individual diseases. Numerous clinical studies indicate that extracellular vesicles secreted by mesenchymal stromal cells help in the therapeutic solution of diseases that up to now do not have sufficiently effective standard treatment. Despite many worldwide studies, clinical regenerative treatment is still in the experimental stage. The reason lies in the complexity of the problem itself, the financial demands, the great heterogeneity of the studies carried out, and the regulatory rules, which differ extremely in individual countries (Fig. 1, Ref. 54). Text in PDF www.lekarsky.herba.sk.

KEY WORDS: mesenchymal stem/stromal cells, extracellular vesicles – exosomes, regenerative medicine, autoimmune diseases, wound healing, rejuvenation, tumor tropism, clinical application.

Lek Obz 2023, 72 (5): 196-204

Úvod

Základ pre regeneračnú medicínu vo forme terapie bunkami položil pred 46 rokmi Friedenstein so spolupracovníkmi, keď izoloval z kostnej drene mezenchýmové kmeňové bunky (MSCs) – morfológicky fibroblastoidné bunky s vysokou proliferatívnou aktivitou a adhérenciou k plasty (1). Boli označené ako kmeňové

bunky, lebo sa dajú *in vitro* indukovať k diferenciácii na celý rad špecializovaných buniek, ako sú osteocyty, chondrocyty, adipocyty. Možno ich *in vitro* transdiferencovať na bunky neurogénne, svalové, kardiocyty, bunky stený ciev a iné vysokošpecializované bunky. Práve tieto vlastnosti spolu s adhérenciou na plast, expresiou CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90 a CD105 na ich po-

vrchu, ako aj neprítomnosťou hematopoetických markerov CD14, CD31, CD45 a CD144, sú základom medzinárodne schválených kritérií, ktoré ich charakterizujú (2). Neskorší výskum dospel k záveru, že to nie sú skutočné kmeňové bunky lebo nevedia tvoriť všetky druhy tkanív. MSCs sú súčasťou strómy mnohých tkanív, a preto sa v literatúre označujú ako kmeňové/stromálne alebo len mezenchýmové stromálne bunky. MSCs uplatňujú svoje priaznivé účinky najmä prostredníctvom parakrinných mechanizmov tým, že sekretujú rôzne imunomodulačné a regeneračné mediátory podporujúce opravu tkanív.

Charakter mezenchýmových kmeňových/stromálnych buniek

A.I. Caplan v roku 2017 navrhol MSCs premenovať na „Medicinal Signalling Cells“, lebo tak lepšie odrážajú skutočnosť, že smerujú na miesto chorobného poškodenia, čím získali kredit liečiva (3). MSCs sa izolujú z mnohých tkanív, ako kostná dreň, tukové tkanivo, pupočníková šnúra, placenta, dentálna pulpa a možno ich *in vitro* zmnožiť na klinickú aplikáciu. Zastúpenie týchto buniek v jednotlivých tkanivách je veľmi rozdielne, čo výrazne ovplyvňuje aj ich ďalšie namnoženie. Výhodným zdrojom je tukové tkanivo, kde ich je približne 2 %, kým v kostnej dreni sú prítomné v 0,005 %. Výťažky MSCs z tkanív určuje aj ich schopnosť replikácie v *in vitro* podmienkach. Z malého množstva dentálnej pulpy sa dá získať dostatočný počet buniek na klinické podanie. Pri dlhodobej kultivácii *in vitro* sa MSCs správajú ako normálne ľudské bunky, t. j. zachovávajú pravidlo Hayflickovho limitu. Bunky po 40 – 60 deleniach podliehajú programovanej bunkovej smrti – apoptóze. Biologická funkcia MSCs spočíva v indukcii opravy opotrebovaných a poškodených tkanív. Preto neprekvapuje, že MSCs izolované od mladších jedincov alebo vývojovo mladších tkanív majú vyšší regeneračný potenciál ako bunky získané od starších darcov (4 – 7). Schopnosť regulovať imunologické odpovede a podporovať prežitie poškodených buniek je hlavným benefitom aplikácie MSCs pri ich terapeutickom použití. Schopnosť MSCs diferencovať na špecializované bunky viedla k predstave, že MSCs injikované do organizmu budú putovať na miesto poškodenia, kde sa zabudujú a následnou diferenciáciou na príslušné bunky tkanivo opravujú, alebo obnovia biologické funkcie zlyhávajúceho orgánu. Pokračujúci výskum funkcie MSCs ukázal, že táto predstava bola mylná.

Terapeutický efekt MSCs je sprostredkovaný ich sekretómom

Na zvieracích modeloch a neskôr aj u ľudí sa opakovane zistilo, že pri intravenóznom podaní označených MSCs väčšina (80 %) z nich skončila dočasne v pľúcach a nedali sa nájsť na mieste poškodenia tkaniva. Bunky boli v priebehu 1 – 2 dní vylúčené z organizmu a táto krátka doba stačila na to, aby v intervale 5 – 8 týždňov došlo k regenerácii poškodenia. Tieto skutočnosti neboli pri reparačnom procese v súhlase

s priamym účinkom transplantovaných kmeňových buniek tak, ako sa to predpokladalo. Potvrdilo sa tak, že MSC-sekretóm je zodpovedný za indukciu a reguláciu endogénnych reparačných procesov organizmu parakrinným účinkom. Mnohé zistenia podporovali to, že sekretóm – plejáda látok, ktoré MSCs vylučujú, má hojivý účinok na rany a má schopnosť pôsobiť na mikroprostredie protizápalovým účinkom (8). MSCs kultivované *in vitro* neustále vylučujú do kultivačného roztoku – média rôzne látky, extrabunkové vezikuly, a tým médium kondiciujú. Kondicionované médium je médium, do ktorého definovaný počet buniek v rastovej fáze bunkového cyklu vylučuje svoj sekretóm po určitú dobu, napr. 24 hodín. MSC sekretóm obsahuje cytokíny, chemokíny, vysoké koncentrácie rastových faktorov, extrabunkové vezikuly, z ktorých MSC-exozómy v koncentrácii približne 10^8 – 10^9 /ml tvoria podstatnú časť. Exozómy slúžia ako prostriedok na medzibunkovú komunikáciu prenášajúc medzi bunkami proteíny, lipidy, mRNA, mikro-RNA a iné biologicky aktívne látky v závislosti od druhu buniek a ich mikroprostredia. Prenos sa deje do susedných buniek, ale aj do buniek vzdialenejších orgánov. Zloženie ich karga závisí od stavu bunky a jej charakteru, a preto extrabunkové vezikuly – exozómy vylučované napr. z nádorových buniek sa považujú za diagnostické markery, ktoré informujú o agresivite nádoru, o liečebnej rezistencii a iných biologických vlastnostiach nádoru. MSC-exozómy okrem toho udržiavajú homeostázu bunky tým, že vylučujú látky, ktoré bunka nepotrebuje, látky, ktoré sú bunke cudzie, alebo prítomné vo vysokej koncentrácii, alebo jej škodia. Objav exozómov sa spätne datuje až do štvrtého desaťročia minulého storočia, keď boli vtedy definované ako bunkový „odpadkový kôš“, a preto sa im nevenovala veľká pozornosť (9). Táto vlastnosť extrabunkových vezikúl sa vďaka novým poznatkom o ich funkcii ako doručovateľa správ medzi bunkami využíva pri cielenej terapii klasickými chemoterapeutikami (10), alebo pri génovej protinádorovej terapii (11).

Všetky tieto sľubné poznatky viedli k vzniku veľkého počtu klinických štúdií na ochorenia, ktoré nemajú uspokojivú terapiu, ako je skleróza multiplex, amyotrofická laterálna skleróza, mŕtvica, akútne a chronické srdcové zlyhanie, reumatická artritída a osteoartritída, Crohnova choroba, chronické ochorenie obličiek alebo pečene, sepsa, kontúzia miechy, kritická ischémia končatiny a iné. Začiatkom apríla 2022 bolo v databáze (<http://www.clinicaltrials.gov>) registrovaných 1413 klinických štúdií pri kľúčovom výraze „mesenchymal stem cells“ a 23 klinických štúdií pri hľadaní „exosomes mesenchymal stem cells“.

Látky, ktoré MSCs vylučujú, sú zodpovedné za indukciu regeneračného procesu

MSC-sekretóm je definovaný ako súbor bioaktívnych faktorov vylučovaných týmito bunkami. Sú to rastové faktory, cytokíny, chemokíny, nukleové kyseliny, lipidy a extrabunkové vezikuly (EVs). EVs preukazujú terapeutický efekt podobný transplantovaným bunkám.

EVs sú heterogénnou skupinou nanočastíc líšiacich sa veľkosťou, spôsobom tvorby, vylučovania a obsahom ich karga. Exozómy podľa novej nomenklatury (12) sú malé extrabunkové vezikuly veľkosti 30 – 150 nm, ktoré bunky vylučujú ako prostriedok na medzibunkovú komunikáciu. Slovo exozómy v tomto prehľadovom článku je používané ako synonymum pojmu malé extrabunkové vezikuly (sEVs). Exozómy – sEVs vylučované z MSCs majú tie isté membránové receptory ako ich bunky, a preto obdobným spôsobom putujú k miestu poškodenia. Exozómy vylučované z MSCs rôznych tkanív preukazujú určitú špecifickosť na rôzne druhy poškodenia. DP-MSC-exozómy výrazne ovplyvňujú transkripciu génov neurogenézy, majú schopnosť regenerovať neuróny lepšie ako exozómy z MSCs kostnej drene. Naproti tomu transkripty v MSC-EVs odvodených z tukového tkaniva by mohli byť užitočné pri omladzovaní pokožky, angiogenéze a pri regenerácii svalov. Sekretóm z MSCs placenty preukazoval lepší účinok pri imunomodulácii ako sekretóm z MSCs pupočníka (13).

Základné vlastnosti extrabunkových vezikúl (EVs)

Extrabunkové vezikuly – exozómy sú malé membránou ohraničené nanočastice, ktoré vo veľkom počte sekretnú všetky bunky tela. Nachádzajú sa vo všetkých biologických tekutinách tela. Tvorja sa v cytoplazme bunky procesom maturácie endozómov. Z bunky sú vylučované procesom vnútorného pučania, čím získavajú povrchové bielkoviny sekretujúcej bunky. Do recipientnej bunky sa dostávajú endocytózou, fúziou alebo cez receptor. Proces je znázornený na obrázku 1.

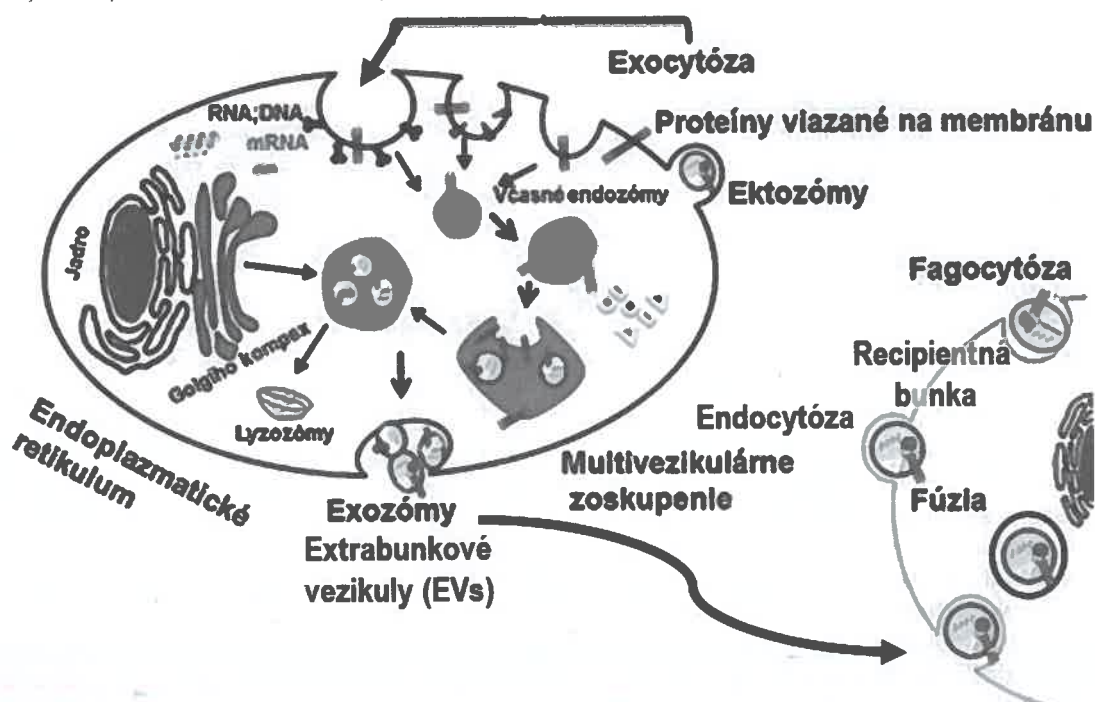
Ukázalo sa, že práve exozómy sú hlavne zodpovedné za regeneračné vlastnosti MSCs. MSC-exozómy re-

gulujú v cieľových bunkách parakrinou signalizáciou procesy, ako je imunomodulácia, apoptóza, angiogenéza a tkanivové prebudovanie (14). MSC-exozómy u recipienta parakrinne stimulujú jeho lokálne špecifické kmeňové bunky, ktoré opravujú poškodenie či vytvoria nové tkanivo (15). Zistenie, že MSCs produkujú peptidy s antibakteriálnym účinkom, dopĺňa tak ich komplexné účinkovanie pri hojení rán (16). Antibakteriálny účinok MSC sekretómu je sprostredkovaný nielen priamo vylučovanými faktormi, ale aj nepriamo aktiváciou vrodených efektorových imunitných buniek (17). Inhalácia kondicionovaného média MSCs izolovaných z kostnej drene a pupočníkovej šnúry veľmi účinne inhibovalo proliferáciu klinických izolátov multirezistentnej baktérie *Klebsiella pneumoniae* (18).

Výhody využitia MSC-EVs v klinických štúdiách oproti použitiu buniek

Liečba mezenchýmovými kmeňovými bunkami sa konvertuje na bezbunkovú terapiu použitím ich nanočastíc. Najväčšou výhodou exozómov oproti bunkám je, že liečba sa stáva oveľa bezpečnejšou. Na rozdiel od buniek nie sú EVs imunogénne, neobsahujú funkčnú genómovú DNA, nemajú jadro buniek, nereplikujú sa, a tým nemôže dôjsť k tomu, že sa bunka usadí na nevhodnom mieste, kde sa pod vplyvom prostredia konvertuje na bunku potenciálne nebezpečnú – napr. bunku nádorovú. Je však potrebné povedať, že počas celého obdobia štúdia MSCs v regeneračnej medicíne nie je o transformácii MSC na bunku nádorovú publikovaný ani jeden spoľahlivý písomný dôkaz. Pri dlhodobej kultivácii *in vitro* nedochádza k ich malígnej transformácii ani pod tlakom priamo pôsobiaceho che-

Obrázok 1. Extrabunkové vezikuly (exozómy). Sú vo všetkých biologických tekutinách tela. Tvorja sa v cytoplazme bunky procesom maturácie endozómov. Z bunky sú vylučované procesom vnútorného pučania, čím získavajú povrchové bielkoviny sekretujúcej bunky. Do recipientnej bunky sa dostávajú endocytózou, fúziou alebo cez receptor.



mického karcinogénu (19, 20). Naopak pri parciálnej resekcií karcinómu prsníka sa často uskutočňuje súčasne rekonštrukcia prsníka tukovým tkanivom, kde sú prítomné MSCs produkujúce extrabunkové vezikuly – exozómy. V kontrolovanej štúdii bolo ukázané, že rekonštrukcia prsníka tukovým tkanivom nezvyšuje riziko rekurencie nádoru oproti patričným kontrolám (21). Výhoda použitia MSC-exozómov v regeneračnej medicíne oproti použitiu MSCs spočíva v tom, že aj napriek ich rozdielnym vlastnostiam je zachovaný terapeutický účinok buniek. Ďalším bonusom sú praktické dôvody pri ich produkcii, skladovaní, atď. MSC-exozómy sú nasmerované, putujú k miestu poškodenia bez rozdielu ich systémovej či lokálnej aplikácie, sú schopné prenikať krvno-mozgovou bariérou, na rozdiel od buniek sa nehromadia v pľúcach, netvorí zhluky. MSCs nie sú všeobecne imunogénne, ich exozómy sú organizmu vlastné. K výrazným výhodám exozómov oproti bunkám patrí ich možnosť doručovať do recipientných buniek mRNA a miRNA, a tak ovplyvňovať expresiu génov a transláciu na funkčné bielkoviny. MSC-exozómy sa ľahko uchovávajú zmrazením na -80°C bez straty ich aktivity, dajú sa sterilizovať filtráciou, lyofilizovať, ich dávkovanie sa dá kontrolovať.

Terapeutické využitie MSC-EVs

Intenzívny výskum v oblasti regeneračnej medicíny ukazuje, že MSC-exozómy sú veľmi účinný inovatívny terapeutický prostriedok na bezbunkovú liečbu rôznych kategórií chorôb. Rastové a imunitné faktory prítomné v MSC extrabunkových vezikulách určujú ich pôsobenie v regeneračných procesoch. Uplatňujú sa pri muskuloskeletálnych poškodeniach kĺbov, platničiek, kostí, šliach. Imunomodulačné pôsobenie MSC-exozómov s prítomnosťou IL-10 sa uplatňuje pri konverzii lymfocytov na regulačné. MSC-exozómy nahrádzajú predtým užívané bunky pri liečbe autoimunitných syndrómov, ako je napr. generalizovaný lupus erythematosus, reumatoidná artritída a diabetes 1. typu. MSC-exozómy sa uplatňujú pri neurodegeneratívnych diagnózach, ako sú skleróza multiplex, Parkinsonova, Alzheimerova choroba a pri poranení miechy. Ich hojivý účinok sa pozoruje pri zápalových procesoch typu ulceróznej kolitídy alebo Crohnovej choroby. MSC-exozómy majú uplatnenie aj pri infarkte myokardu, pri traumatickom poškodení mozgu a miechy a pri reparácii nefunkčnosti obličiek. Všetky tieto úspešné výsledky s exozómami alebo s kondicionovaným médiom z ľudských MSCs boli realizované na zvieracích modeloch, čo je umožnené ich neimunitnou povahou. V literatúre nechýbajú ani zmienky o pokusoch terapeuticky ovplyvniť autizmus. Intranazálna aplikácia exozómov z ľudských MSCs na myšom modeli autizmu ukázala pozitívny efekt spočívajúci v zlepšení vzájomných vzťahov medzi zvieratami. Neboli pozorované žiadne vedľajšie účinky (22).

Využitie MSC-EVs pri riešení jednotlivých ochorení

Štúdie využívajúce MSC-EVs na ovplyvnenie autoimunitných ochorení

Autoimunitné stavy sú charakterizované abnormálnou imunitnou odpoveďou, ktorá vedie k deštrukcii zdravých buniek telesných orgánov. MSC-EVs pre svoju schopnosť účinne modulovať imunologickú odpoveď majú terapeutický potenciál pri autoimunitných ochoreniach (23). V predklinických štúdiách na zvieracích modeloch sa MSC-exozómy ukázali ako úspešný terapeutický prostriedok okrem iného pri diabetes mellitus 1. typu, roztrúsenej skleróze, pri zápalovom ochorení čreva, pri reumatoidnej artritíde, pri psoriáze, autoimunitnej encefalomyelitíde, pri autoimunitnej uveitíde a pri potlačení reakcie štepu proti hostiteľovi (GvHD). V dobe písania tohto článku v americkej databáze klinických štúdií bolo registrovaných 10 klinických štúdií orientovaných na riešenie autoimunitných syndrómov pomocou EVs derivovaných z MSCs.

MSCs a MSC-EVs pri potlačení reakcie štepu proti hostiteľovi (GvHD)

Prvé úspešné použitie MSCs z kostnej drene (BM-MSCs) realizovala švédská skupina vedcov v roku 2004 u dieťaťa s akútnou GvHD (24). Následné klinické štúdie ukázali, že intravenózne podané MSCs potláčajú voči steroidom rezistentnú, život ohrozujúcu akútnu GvHD (25). Mechanizmus účinku intravenózne podaných buniek končiacich hlavne v pľúcach spočíva v silnom lokálnom a systémovom imunomodulačnom účinku na imunitný systém hostiteľa. MSC-EVs znižujú produkciu prozápalových cytokínov IL-1 β , TNF- α a IFN- γ . Infúzia stromálnych buniek je bezpečná, dobre tolerovaná a len u obmedzeného počtu pacientov spôsobuje miernu horúčku, ale vo viacerých štúdiách bezpečnosti neboli hlásené žiadne závažné vedľajšie účinky. Dnes je táto terapia registrovaná pre akútnu GvHD v Japonsku a pre GvHD u detí v Kanade a na Novom Zélande a je tolerovaná liekovou agentúrou FDA v USA. Na Slovensku Transplantačná jednotka kostnej drene Národného ústavu detských chorôb v Bratislave využíva BM-MSCs na zvládnutie voči steroidom rezistentnej akútnej GvHD. BM-MSCs sa pripravujú na Oddelení prípravy kmeňových buniek na Onkologickom ústave sv. Alžbety v tkanivovom zariadení, ktoré spĺňa podmienky na prípravu klinicky aplikovaného materiálu. Pokračujúci intenzívny celosvetový výskum MSCs ukazuje, že MSC-EVs, rovnako ako bunky, sú schopné potlačiť terapeuticky refraktérnu akútnu GvHD (26). Uplatnenie EVs z MSCs pupečníka pri liečbe syndrómu suchého oka u pacientov s chronickou GvHD je predmetom klinickej štúdie NCT04213248. Dal Collo et al. skúmali možnosť využitia MSC-EVs na prevenciu akútnej GvHD pri alogénnej transplantácii hematopoetických buniek. Na myšom modeli GvHD ukázali, že MSC-EVs produkované v definovaných podmienkach s využitím lyzátnych krvných doštičiek ako rastového faktoru produkujú EVs, ktoré zabráňujú vzniku akútnej GvHD (27).

Ochorenia spojené s neregulovateľným zápalom a MSC-EVs a hojenie rán

Zápal vzniká ako imunologická obranná reakcia organizmu proti patogénom. Zápal je primárne sprostred-

kovaný vrodenými imúnnymi faktormi, ako sú IL-1, IL6, cytokíny, chemokíny a bunky vrodenej imunity. Problém so zápalom nastáva pri neregulovateľnej nadštandardnej imunitnej odpovedi, čo vedie k zápalovým a autoimunitným ochoreniam. Nekontrolovaný zápal sa považuje za príčinu mnohých chorôb, ako sú infarkt myokardu, cievna mozgová príhoda, diabetes 2. typu, Alzheimerova choroba a dokonca aj výskyt nádoru sa spája so zápalom. MSCs fungujú v organizme ako vnútorný regulátor zápalu, vyznačujú sa schopnosťou imunosupresie a znižujú zápal a imunitnú odpoveď na zápalové stimuly. MSC-exozómy ako protizápalové a imunomodulačné nanočastice sú teda lepšou náhradou na reguláciu zápalu ako bunky. Na klinické použitie sa ich produkcia zvyšuje kultiváciou buniek v trojrozmernom priestore bioreaktora, kde sa exozómy kontinuálne oddeľujú z média v kazete s dutými vláknami s 20 kDa pórmami (28). Hojenie rán je veľmi komplexný proces, pri ktorom v istom časovom súlade dochádza k rozdielnym aktivitám, ako je proliferácia buniek, diferenciácia bunkových zložiek kože, diferenciácia buniek imunitného systému a indukcia angiogenézy. Ukázalo sa, že MSC-exozómy indukujú tieto endogénne procesy organizmu a prispievajú k urýchleniu hojenia rán (29). Subkutánne podané MSC-exozómy urýchľujú hojenie rán tým, že podporujú tvorbu kolagénu typu I a III a sekreciu elastínu z fibroblastov. MSC-exozómy majú dôležitú úlohu pri dozrievaní krvných kapilár v mieste poškodenia. MSC-exozómy ako protizápalové a imunomodulačné nanočastice sú teda lepšou a bezpečnejšou náhradou buniek. Jeden z molekulových mechanizmov regeneračného hojenia rán spočíva v inhibícii receptora transformačného rastového faktora beta (30). Všeobecne platí, že lokálna aplikácia MSC-exozómov na miesto poškodenia a ich protizápalové pôsobenie je účinnejšie ako jednorazové intravenózne podanie. Z týchto dôvodov sa stále viac uplatňuje ich podanie v podobe hydrogélů. Americkou FDA a Európskou liekovou agentúrou je schválený prípravok Pluronic F127, do ktorého sa dajú vkladať exozómy, kondicionované médium, ale aj bunky. Pluronic F127, v určitej koncentrácii, tvorí roztok pri 4 °C a stáva sa gélom pri 37 °C (31).

Použitie MSCs a MSC-EVs na liečbu ischémie končatín

Prvú slovenskú regeneračnú štúdiu využívajúcu MSCs inicioval J. Madarič so spolupracovníkmi na Národnom ústave kardiovaskulárnych chorôb v Bratislave. Výsledky liečby pacientov s kritickou ischémiou končatiny (CLI) pomocou aplikácie autológnych MSCs z kostnej drene bola publikovaná už pred 11 rokmi (32). Odvtedy bolo publikovaných veľa štúdií potvrdzujúcich, že mezenchýmové stromálne bunky a ich EVs môžu poskytnúť záchrannú terapiu u pacientov s nevyhnutnosťou amputácie končatiny (33). Najnovší trend vo využití MSC-EVs na opravu nehojajúcich sa rán diabetických končatín spočíva v predĺžení času kontaktu EVs v mieste rany. Dosahuje sa to prostredníctvom použitia lokálne aplikovaných biogélov obsahujúcich spolupôsobiacie EVs z MSC a z krvných doštičiek (34).

MSC-EVs a osteoartritída

Osteoartritída (OA) je chronické ochorenie kĺbu charakterizované miernym systémovým zápalom, degeneráciou kĺbových tkanív, ako je kĺbová chrupka a zmenou kostných štruktúr. Na patogenéze sa podieľajú EVs vylučované kĺbovou chrupkou, zvýšená produkcia zápalových mediátorov a proteínázy, ktoré degradujú chrupky. MSC-EVs a EVs z krvných doštičiek sú hlavným prostriedkom na liečbu OA tým, že inhibujú zápalové makroprostredie, konvertujú prozápalové M1 makrofágy na M2 makrofágy, ktoré pôsobia protizápalovo a znižujú apoptózu chondrocytov. Okrem toho môžu byť tieto EVs pridané do hydrogélů na zlepšenie zacielenia a protirahované pôsobenie, čo zvyšuje účinnosť OA liečby (35). Tieto poznatky boli získané hlavne na myších modeloch. Cosenza et al. na kolagénom indukovanej artritíde pozorovali protizápalový účinok na lymfocyty T a B vyvolaný BM-MSC-EVs. Terapeutický účinok sa zvýšil, keď do karga MSC-EVs boli začlenené špecifické miRNA (36).

MSC-EVs pri liečebnom ovplyvnení neurokognitívnych porúch

Kmeňové bunky z dentálnej pulpy (DP-MSC) sa odlišujú od buniek izolovaných z kostnej drene (BM-MSC) alebo tukového tkaniva v expresii pluripotentných génov, čo je hlavne dôsledok ich embryonálneho neuroektodermálneho pôvodu a charakteru (37). Vylučované extracelulárne vezikuly neurotropného typu obzvlášť z dentálnej pulpy detských vypadávajúcich zubkov sú predmetom intenzívneho výskumu na použitie pri liečbe neurodegeneratívnych chorôb. Ich výhodou oproti kmeňovým bunkám izolovaných z kostnej drene alebo podkožného tuku je to, že sa získavajú minimálne invázivným spôsobom so zanedbateľnými etickými námietkami. Okrem toho neutropný charakter DP-MSC-exozómov ich umožňuje aplikovať intranazálne. Imunomodulačné pôsobenie MSC-exozómov nahrádza pôvodne používané bunky pri liečbe autoimunitných syndrómov, ako je napr. generalizovaný lupus erythematosus, reumatoidná artritída a diabetes 1. typu. DP-MSC-exozómy sa uplatňujú pri neurodegeneratívnych diagnózach, ako sú skleróza multiplex, poranenie miechy, Parkinsonova a Alzheimerova choroba.

MSC-EVs pri omladzovaní buniek a telesných orgánov

So starnutím ľudskej populácie neustále rastú problémy s chorobami súvisiacimi s vekom. Starnutie buniek spôsobené tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v dôsledku vystavenia žiareniu alebo farmakologickým látkam vedie k poškodeniu DNA a k následnej dysfunkcii telomér počas bunkového delenia. Omladzovacia schopnosť MSC-EVs sa javí ako prostriedok na zlepšenie tohto stavu. Pred viac ako 40 rokmi vedci ukázali na modeli myši, že organizmus možno omladiť. Omladili staré myši pomocou tvorenia parabiotických párov s mladými myšami. Vystavenie starých myši faktorom prítomným v mladom sére viedlo k zvýšeniu regenerač-

nej kapacity ich kmeňových buniek. Dôležitým zistením bolo, že zvýšená regenerácia starnúceho svala bola spôsobená takmer výlučne aktiváciou rezidentných starnúcich buniek a nie prihojeniu cirkulujúcich progenitorových buniek z mladých myší (38). Dnes vieme, že EVs z vývojovo mladých stromálnych MSCs sú zodpovedné za indukciu endogénnych reparačných procesov v jednotlivých orgánoch. EVs sekretované z MSCs pupočníkovej šnúry (UC-MSCs), ako tkaniva veľmi mladého blízkeho embryonálnym bunkám, vedia spomaliť procesy starnutia a tým organizmus omladiť (39). Starnutie ľudí sa prejavuje dobre pozorovateľnými zmenami na pokožke, ale dochádza aj k zníženej funkcii telesných orgánov. Vekom podmienená znížená prirodzená schopnosť reparácie obličiek vedie k dramaticky zvýšenému výskytu chronického ochorenia obličiek u starších ľudí, ktoré môže byť spojené s výskytom ďalších diagnóz, ako sú kardiovaskulárne ochorenia a systémová zápalová ateroskleróza (40).

MSC-EVs z buniek pupočníka zmiernujú progresiu chronických obličkových ochorení. Celková funkcia obličiek sa zlepšila aj u pacientov III. – IV. stupňa choroby.

Starnutie kmeňových buniek kultivovaných *in vitro* sa prejavuje senescenciou, zníženou schopnosťou replikácie, predlžovaním doby zdvojovania buniek a zníženou kontrolou apoptózy. Proces sa dá zvrátiť pomocou inkubácie s EVs z UC-MSCs.

Terapeutické uplatnenie MSC-EVs v dermatológii

MSC-EVs majú dôležitú imunomodulačnú úlohu viacerých zápalových kožných poruchách vrátane psoriázy, atopickej dermatitídy, lichen planus, bulózneho epidermolýzy, systémového lupus erythematosus a hojenia chronických rán. Na myších modeloch sa ukázalo, že MSC-EVs sa integrujú do dermálnych fibroblastov a následne znižujú bunkovú senescenciu, indukujú angiogénu a *de novo* syntézu kolagénu a imunomodulujú mikroprostredie. Dôležitú imunomodulačnú funkciu plnia makrofágy M1 prítomné v kožnom poškodení. MSC-EVs polarizujú ich prozápalový fenotyp na protizápalový reparačný fenotyp M2. Yoon-Jin Kim so spolupracovníkmi v experimentoch na ľudskej koži zistili, že zafarbené MSC-EVs z kondicionovaného média behom 18 hodín penetrujú do epidermálnej vrstvy kože. MSC-EVs v kondicionovanom médiu sa vstrebávajú do ľudskej pokožky a po troch dňoch od aplikácie sa detegovala zvýšená tvorba kolagénu I a elastínu v pokožke, čo viedlo k jej omladeniu (41). Aj keď povrchová kožná aplikácia MSC-EVs preukazuje regeneračný účinok, proces sa dá urýchliť mikroinjekciou alebo aplikáciou hydrogélů (scaffold) obsahujúcich MSC-EVs. EVs, pochádzajúce hlavne z mladých mezenchýmových stromálnych buniek, akými sú UC-MSC-EVs alebo DP-MSC-EVs, sa uplatňujú pri prevencii fotooxidačného poškodenia pokožky a podporujú omladenie kože. Regeneračná schopnosť UC-MSC-EVs pri liečbe rán sa dá zvýšiť lokálnou aplikáciou na miesto poškodenia ich proťahovaným podávaním pomocou termoreagujúceho hydrogélu Pluronic F127 (42). Regeneračná aktivita a nasmerova-

nie MSC-EVs sa dá ovplyvniť vhodne zvolenými miRNA. MSC-EVs získané z pupočníkovej krvi obohatené o miR-21-3p podporovali proliferáciu a migráciu fibroblastov a zároveň urýchlili angiogénu a opätovnú epitelizáciu (43). Niekoľko výskumných štúdií preukázalo, že lokálna aplikácia MSC-EVs vedie k zlepšeniu chronických zápalových kožných ochorení, ako je psoriáza. Terapeutický efekt bol sprostredkovaný zmiernením uvoľňovania IL-17 z neutrofilov (44). Podobné zlepšenia sa pozorovali aj vo výskumných štúdiách zameraných na účinky lokálnej aplikácie MSC-EVs z podkožného tuku na liečbu atopickej dermatitídy (45). Využitie MSC-EVs v dermatológii je predmetom klinických štúdií. MSC-EVs majú potenciálne kozmetické uplatnenie (46). Klinické štúdie nasmerované na hodnotenie ich bezpečnosti a účinnosti bolo prehľadovo spracované (47).

Terapeutický účinok MSC-EVs na diabetes mellitus 1. typu

Eliminácia Langerhansových ostrovčiek β -buniek pankreasu autoimunným prostredím je charakteristický znak diabetes mellitus 1. typu (T1DM). Výsledky randomizovanej klinickej štúdie už pred niekoľkými rokmi u pacientov s T1DM preukázali liečebný potenciál MSCs zachovaním funkcie β -buniek (48). Na myšom modeli T1DM EVs z UC-MSCs sa ukázali ako bezpečnejší a rovnako účinný prostriedok na zmiernenie príznakov choroby (49). Diabetická periférna neuropatia (DPN) je jednou z hlavných komplikácií cukrovky, ktorá výrazne obmedzuje kvalitu života diabetických pacientov. MSC-EVs zmiernujú neurovaskulárnu dysfunkciu a potlačením prozápalových génov zlepšujú DPN (50). MSC-EV odvodené z kostnej drene sa ukázali ako dobrý prostriedok na zvýšené prežívanie pankreatických ostrovčiek pri transplantačnej liečbe diabetu.

Terapeutický účinok MSC-EVs na diabetes mellitus 2. typu

Odhaduje sa, že polovica ľudí vo veku 65 rokov trpí zhoršenou glukózovou toleranciou (HbA1c krvný test v rozmedzí 42 – 47 mmol/mol), ktorá vedie k cukrovke 2. typu. Choroba je úzko spojená s obezitou aj kardiovaskulárnymi ochoreniami. Bolo dokázané, že MSC-exozómy upravujú prozápalové prostredie na protizápalové, ktoré sa takto udržuje dlhodobo, čo vedie k väzbe inzulínu na jeho receptory zvýšenou afinitou. MSC-exozómy potláčajú apoptózu betabuniek v pankrease a zvyšujú produkciu inzulínu (51). MSC-EVs majú aj vedľajší priaznivý účinok na zmiernenie sarkopénie svojím proangiogénnym pôsobením a produkciou vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF) (52).

Uplatnenie MSCs a MSC-EVs pri liečbe pacientov infikovaných SARS-CoV-2 vírusom

Pandémia spôsobená koronavírusom zintenzívnila výskum použitia MSCs na zmiernenie či liečbu následkov vírusovej infekcie. V mnohých klinických štúdiách sa ukázalo, že intravenózna aplikácia buniek vedie k dramatickému zlepšeniu stavu pacientov odkázaných

na kyslíkovú ventiláciu. Je to v dôsledku toho, že 80 % intravenózne podaných buniek skončí v pľúcach, ktoré sú najviac postihnuté. Tak ako v iných regeneračných liečbach aj tu sú za terapeutický efekt zodpovedné bunkami produkované EVs. Regeneračná schopnosť MSC-exozómov sa ukazuje ako vhodný pleiotropný liečebný prostriedok na zvládnutie fatálnej pneumónie vyvolanej pri COVID-19 pacientov infekciou koronavírusom SARS-CoV-2. Bolo preukázané, že inhalácia MSC sekretómu v podobe kondicionovaného média alebo izolovaných MSC-exozómov pomocou nebulizátora alebo intranazálnym podaním má pozitívny efekt pri liečbe COVID-19 pacientov s obojstranným zápalom pľúc ohrozujúci ich život, ale aj pri liečbe pacientov s neskoršími následkami spôsobenými infekciou SARS-CoV-2 vírusom. Nedávno bol zverejnený výsledok americkej klinickej štúdie, kde intravenózne podanie 100 miliónov MSCs COVID-19 pacientom v kritickom stave spôsobilo vymiznutie zlyhania viacerých orgánov, zotavenie sa z kómy a obnovenie neurologických, pľúcnych, pečeno-vých a renálnych funkcií 24 hodín po injekcii buniek (53). FDA tak schválila aplikáciu alogénnych MSCs kriticky chorým COVID-19 pacientom. Na Slovensku sa napriek dostupnosti klinicky aplikovateľných produktov MSCs žiadna liečba neuskutočnila.

Nádorový tropizmus MSCs a ich extrabunkových vezikúl – exozómov

Všeobecná úloha MSCs ako systém opravy poškodenia tkanív v organizme sa prejavuje aj v tom, že bunky rozoznávajú nádor ako poškodenie a v snahe opraviť ho, putujú k nádoru, a tým sa stávajú súčasťou nádorovej strómy. To isté platí o exozómoch, ktoré vy-lučujú. V závislosti od pôvodu MSCs a druhu nádoru môžu rast nádoru podporovať, ale aj inhibovať. Zápalový proces v mieste vzniku a rastu nádoru sa považuje za možnú príčinu nádorového tropizmu MSCs. Túto vlastnosť zdieľajú aj ich exozómy. MSCs bunky či MSC-exozómy podporujú progresiu nádoru tým, že produkujú rastové faktory. MSCs konvertujú na nádor asociované fibroblasty, tvoriac tak časť strómy nádoru. MSC-exozómy stimulujú nádorovú angiogénu, inhibujú apoptózu nádorových buniek a majú aj imunomodulačné vlastnosti. Z týchto dôvodov je použitie MSCs a ich extrabunkových vezikúl v regeneračnej medicíne kontraindikované u onkologických pacientov.

Nádorový tropizmus MSC-exozómov sa dá využiť na cielený transport chemoterapeutík do ťažko dostupných nádorov využívajúc schopnosť exozómov preniknúť hematoencefalickú bariéru. MSC-exozómy sa využívajú na nádor nasmerovanú génovú terapiu ich modifikáciou niektorými terapeutickými molekulami, ako sú miRNA, anti-miRNA, špecifické mRNA, a mRNA samovražedných génov (11). MSC-exozómy modifikované miR-126-3p inhibujú rast karcinómu pankreasu, miR143-3p nádory prsníka a miR-205 prostatický karcinóm. Pozorovala sa aj ich prirodzená inhibícia rastu nádorových buniek spôsobená inhibíciou AKT and Wnt signálnych dráh.

Regulácie klinického využitia MSCs a ich EVs

Veľký počet registrovaných klinických štúdií využívajúcich MSCs na liečbu diagnóz, ktoré nemajú úspešnú liečbu, viedol k pravidlám, podľa ktorých je potrebné postupovať pri ich príprave, aby boli klinicky využiteľné. MSCs boli klasifikované Európskou liekovou agentúrou v roku 2016 ako pokročilý medicínalný liečebný produkt (Advanced Therapy Medicinal Product – ATMPs). Jedným z atribútov, ktoré charakterizujú ATMPs je prítomnosť bunkového jadra alebo aktívnej transgéennej zložky. Extenzívny výskum terapeutických schopností MSCs viedol k zisteniu, že ich terapeutický potenciál spočíva v produkcii extrabunkových vezikúl – MSC-exozómov, ktoré vedia nahradiť aplikáciu buniek. Extrabunkové vezikuly typu exozómov nie sú predmetom regulácií FDA na rozdiel od buniek, nemajú karcinogénny potenciál, a preto ich možno používať v klinických štúdiách. Podľa stanoviska ISEV (Internacionalna spoločnosť pre extrabunkové vezikuly) EVs a aj EVs produkované z geneticky modifikovaných MSCs sa považujú za biologický medicínsky produkt (54). MSC-exozómy neobsahujú ani jadro, ani transgéenný produkt, preto nepatria do kategórie produktov charakterizovaných ako ATMP. Kondicionované médium obsahujúce MSC-exozómy (médium, v ktorom sa MSCs kultivujú) odpovedá charakteru biologického produktu/lieku podľa zákona 362/2011 Z.z. Podľa stanoviska Štátneho ústavu pre kontrolu liečiv možno produkt testovať formou biomedicínskeho výskumu, špecificky prostredníctvom klinického skúšania. Na jeho použitie v klinickom skúšaní je potrebné schválenie od ŠÚKL (do 90 dní podľa § 35 ods. 1 písm. b bod 4) a kladné stanovisko nezávislej etickej komisie. Použitie MSC-exozómov v klinických štúdiách sa navrhuje pri diagnózach, kde nie je vhodná terapia a kde sa využili všetky štandardné liečebné postupy s neuspokojivým výsledkom. Takýto produkt sa v EU dá použiť u jednotlivých pacientov pod zodpovednosťou konkrétnej nemocnice, alebo podávajúceho lekára. Produkcia MSCs pre klinickú aplikáciu nie je lacná záležitosť a pre možnosť vzniku chromozómových aberrácií pri dlhodobom kultivovaní MSCs sa odporúča ich používanie len do tretej pasáže *in vitro*. Kondicionované médium sa dá získavať opakovane z veľkého počtu buniek kultivovaných vo veľkopovrchových bioreaktoroch, čím sa znižujú finančné náklady. Z praktického hľadiska sa kondicionované médium dá bez problémov uskladňovať zmrazené pri -80°C nekonečne dlho a je k dispozícii okamžite po rozmrazení. Naša skúsenosť a literárne dôkazy svedčia o tom, že ho možno lyofilizovať bez straty biologickej aktivity, čo ho zaraďuje medzi typické liekové formy. Stále pokračujúci intenzívny výskum extrabunkových nanočastíc – exozómov z rôznych buniek poukazuje na ich značnú veľkostnú heterogénnosť, ktorá sa odráža aj v ich biologickej aktivite. Napriek terapeutickým úspechom MSC-EVs, dokumentovaným množstvom predklinických štúdií na zvieracích modeloch a v klinických štúdiách, ich schvaľovanie v regulačných orgánoch naráža často aj na opodstatnené váhanie. Častým argumentom je, že sa

nevie, či ich aplikácia nebude mať následky po rokoch. Jedným z argumentov o neškodnosti exozómov môže byť transfúzia krvi pacientom s najrôznejšími diagnózami a zdravotnými situáciami. V plazme ľudskej krvi sa nachádzajú exozómy v počte 10^{8-9} /ml, ktoré sa dostávajú pri transfúzii krvi do ich tela. Mnohoročná skúsenosť a nespočetné množstvo transfúzií nepreukazuje u recipientov následné zdravotné problémy.

Záverečné zamyslenie

Nie je pochyb o tom, že EVs-exozómy z mezenchýmových kmeňových/stromálnych buniek sú veľmi užitočným prostriedkom na liečbu a zmiernenie mnohých chorôb, ktoré doteraz nemajú úspešnú štandardnú terapiu. Ich zavedenie do klinickej praxe vyžaduje testovanie ich účinku v kontrolovaných dvojito zaslepených klinických štúdiách tak, ako je v medicíne zvykom. Vlastnosti MSC-EVs sú však veľmi rozmanité, obsah ich karga je veľmi komplexný (viac ako 150 bielkovín, miRNA a ďalších zložiek). Ich nasmerovanie závisí od druhu buniek, ich pôvodu, spôsobov kultivácie buniek, metód ich izolácie a ďalších faktorov, čo je príčinou mnohých námietok na ich použitie v klinike. MSC-EVs možno modifikovať, obohatiť o ďalšie liečivá, a teda je ťažké ich dostatočne charakterizovať, aby odpovedali prísny kritériám pre väčšinu chemicky exaktne definovaných zlúčenín zapísaných v liekopisoch. Jedným z možných riešení tohto problému komplexnosti prípravkov MSC-EVs sa nám javí možnosť pripraviť sekretóm, kondicionované médium alebo MSC-EVs vo veľkom množstve, charakterizovať ho a namraziť v použiteľných dávkach na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takýto preparát opakovane používať v klinických štúdiách, a tým zaručiť, že podávaný potenciálny liek je stále rovnaký. Nedá sa očakávať sto-percentná účinnosť terapií, lebo stav pacienta a jeho genóm má dôležitú úlohu v tejto terapii. Výsledky pilotných štúdií tohto druhu hovoria o 80 % účinnosti aj u pacientov s „no option“ kvalifikáciou, čo predstavuje nádej pre mnohých pacientov s chorobami bez doteraz úspešnej liečby.*

***Autori prehlasujú**, že štúdia bola realizovaná v súlade s etickými štandardmi príslušnej komisie zodpovednej za klinické štúdie a Helsinskou deklaráciou z roku 1975, revidovanou v roku 2000. Konflikt záujmov: **autori Čestmír ALTANER, Ursula ALTANEROVÁ, Jana JAKUBECHOVÁ, Peter ŠVEC, Juraj KAUSITZ** vyhlasujú, že nemajú žiaden konflikt záujmov.

Literatúra

1. FRIEDENSTEIN AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976, 47: 327 – 359.
2. DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8 (4): 315 – 317. DOI: 10.1080/14653240600855905
3. CAPLAN AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *STEM CELLS Translational Medicine* 2017, 6 (6):1445 – 1451. DOI:10.1002/sctm.17-00516.
4. MAREZIAK M, MARYCZ K, TOMASZEWSKI KA, et al. The influence of aging on the regenerative potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2016, 2152435.
5. STOLZING A, JONES E, MCGONAGLE D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 2008, 129: 163 – 173.
6. ZHANG N, ZHU J, MA Q, et al. Exosomes derived from human umbilical cord MSCs rejuvenate aged MSCs and enhance their functions for myocardial repair. *Stem Cell Res Ther* 2020, 11 (1): 273. DOI: 10.1186/s13287-020-01782-9.
7. STANKO P, ALTANEROVA U, JAKUBECHOVA J, et al. Dental Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Exosomes. *Stem Cells Int* 2018, 2018: 8973613. DOI: 10.1155/2018/8973613.
8. BURKE J, KOLHE R, HUNTER J, et al. Stem Cell-Derived stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling Exosomes: A Potential Alternative Therapeutic Agent in Orthopaedics. *Stem Cells International* 2016, 1 – 6. DOI: 10.1155/2016/5802529
9. TRAMS CJ, LAUTER N, SALEM J, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of microvesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes* 1987, 645: 63 – 70.
10. LI YJ, WU JY, WANG JM, et al. Gemcitabine loaded autologous exosomes for effective and safe chemotherapy of pancreatic cancer. *Acta biomaterialia* 2020, 101: 519 – 530.
11. ALTANEROVA U, JAKUBECHOVA J, BENEJOVA K, et al. Prodrug suicide gene therapy for cancer targeted intracellular by mesenchymal stem cell exosomes. *Int J Cancer* 2019, 144: 897 – 908. DOI: org/10.1002/ijc.31792
12. THÉRY C, WITWER KW, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018, 7: 1535750. 10.1080/20013078.2018.1535750
13. TALWADEKAR MD, KALE VP, LIMAYE LS. Placenta-derived mesenchymal stem cells possess better immunoregulatory properties compared to their cord-derived counterparts - a paired sample study. *Sci Rep* 2015, 5: 15784.
14. WANG L, HU L, ZHOU X, et al. Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. *Sci Rep* 2018, 8 (1): 7066. DOI: 10.1038/s41598-018-24991-y
15. PHINNEY DG, PITTENGER MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells* 2017, 35 (4): 851 – 858. DOI: 10.1002/stem.2575
16. KRASNODEMSKAYA A, SONG Y, FANG X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells* 2010, 28 (12): 2229 – 2238. DOI: 10.1002/stem.544
17. CHOW L, JOHNSON V, IMPASTATO R, et al. Antibacterial activity of human mesenchymal stem cells mediated directly by constitutively secreted factors and indirectly by activation of innate immune effector cells. *Stem Cells Transl Med* 2020, 9 (2): 235 – 249. DOI: 10.1002/sctm.19-0092.
18. MCCARTHY SD, HORGAN E, ALI A, et al. Nebulized Mesenchymal Stem Cell Derived Conditioned Medium Retains Antibacterial Properties Against Clinical Pathogen Isolates. *Aerosol. Med Pulm Drug Deliv* 2020, 33 (3): 140 – 152. DOI: 10.1089/jamp.2019.1542.
19. BERNARDO ME, ZAFFARONI N, NOVARA F, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo telomere maintenance after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007, 67 (19): 9142 – 9149.
20. ALTANEROVA V, HORVATHOVA E, MATUSKOVA M, et al. Genotoxic damage of human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells triggers their terminal differentiation. *Neoplasma* 2009, 56 (6): 542 – 547. DOI: 10.4149/neo_2009_06_542.
21. KRONOWITZ SJ, MANDUJANO CC, LIU J, et al. Lipofilling of the breast does not increase the risk of recurrence of breast cancer: a matched controlled study. *Plast Reconstr Surg* 2016, 137 (02): 385 – 393.
22. PERETS N, ORON O, HERMAN S, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells improved core symptoms of genetically modified mouse model of autism Shank3B. *Mol Autism* 2020, 11 (1): 65. DOI: 10.1186/s13229-020-00366-x.

23. MARTINEZ-ARROYO O, ORTEGA A, FORNER MJ, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Non-Coding RNA Therapeutic Vehicles in Autoimmune Diseases. *Pharmaceutics* 2022, 14 (4): 733. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040733
24. RINGDEN O, UZUNEL M, RASMUSSEN I, et al. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation* 2006, 81 (10): 1390 – 1397. DOI: 10.1097/01.tp.0000214462.63943.14
25. Le BLANC K, FRASSONI F, BALL L, et al. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Steroid-Resistant, Severe, Acute Graft-Versus-Host Disease: A Phase II Study. *Lancet* 2008, 371 (9624): 1579 – 1586. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X
26. KORDELAS L, REBMANN V, LUDWIG AK, et al. MSC-Derived Exosomes: A Novel Tool to Treat Therapy-Refractory Graft-Versus-Host Disease. *Leukemia* 2014, 28 (4): 970 – 973. DOI: 10.1038/leu.2014.41
27. DAL COLLO G, ADAMO A, GATTI A, et al. Functional dosing of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for the prevention of acute graft – versus-host-disease. *Stem Cells* 2020, 38 (5): 698 – 711. DOI: 10.1002/stem.3160
28. YAN L, WU X. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity. *Cell Biol Toxicol* 2020, 36 (2): 165 – 178.
29. SHABBAR A, COX A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal Stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro. *Stem Cells Dev* 2015, 24: 1635 – 1647.
30. ZHANG Y, PAN Y, LIU Y, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor-beta receptor inhibition. *Stem Cell Res Ther* 2021, 12 (1): 434. DOI: 10.1186/s13287-021-02517-0
31. ZHOU Y, ZHANG XL, LU ST, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration. *Stem Cell Research & Therapy* 2022, 13: 407. DOI.org/10.1186/s13287-022-02980-3
32. KLEPANEC A, MISTRIK M, ALTANER C, et al. No Difference in Intra-Arterial and Intramuscular Delivery of Autologous Bone Marrow Cells in Patients With Advanced Critical Limb Ischemia. *Cell Transplantation* 2012, 21: 1909 – 1918. DOI: DOI.org/10.3727/096368912X636948
33. JALUVKA F, IHNAT P, MADARIC J, et al. Current Status of Cell-Based Therapy in Patients with Critical Limb Ischemia. *Int J Mol Sci* 2020, 21 (23): 8999. DOI: 10.3390/ijms21238999
34. NALLAKUMARASAMY A, JEYARAMAN M, MAFFULLI N, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Wound Healing. *Life (Basel)* 2022, 12 (11): 1733. DOI: 10.3390/life12111733.
35. YIN B, NI J, WITHEREL CE, et al. Harnessing Tissue-derived Extracellular Vesicles for Osteoarthritis. *Theranostics* 2022, 2 (1): 207 – 231. DOI: 10.7150/thno.62708
36. COSENZA S, TOUPET K, MAUMUS M, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than micro-particles in inflammatory arthritis. *Theranostics* 2018, 8 (5): 1399. DOI: 10.7150/thno.21072
37. STANKO P, KAISEROVA K, ALTANEROVA V, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014, 158 (3): 373 – 377.
38. CONBOY IM, CONBOY MJ, WAGERS AJ, et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005, 433 (7027): 760 – 764. DOI:10.1038/nature03260
39. QIAN LEI, FEI GAO, TENG LIU, et al. Extracellular vesicles deposit PCNA to rejuvenate aged bone marrow-derived mesenchymal stem cells and slow age-related degeneration. *Sci Transl Med* 2021,13 (578): eaaz8697. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaz8697.
40. BIKBOV B, PURCELL CA, LEVEY AS, et al. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990 – 2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2020, 395: 709 – 733. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30045-3.
41. YOON-JIN KIM, SAE MI YOO, HWAN HEE PARK, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin *Biochem Biophys Res Commun* 2017, 493 (2): 1102 – 1108. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.056.
42. YANG J, CHEN Z, PAN D, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes combined pluronic F127 hydrogel promote chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration. *Int J Nanomedicine* 2020, 15: 5911 – 5962. DOI.org/10.2147/IJN.S249129.
43. HU Y, RAO SS, WANG ZX, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics* 2018, 8 (1): 169 – 184. DOI./10.7150/thno.21234
44. ZHANG B, LAI RC, SIM WK, et al. Topical application of mesenchymal stem cell exosomes alleviates the imiquimod induced psoriasis-like inflammation. *Int J Mol Sci* 2021, 22 (2): 720. DOI:10.3390/ijms22020720
45. DAVIESA OG, WILLIAMS S, GOLDIEB K. The therapeutic and commercial landscape of stem cell vesicles in regenerative dermatology. *Journal of Controlled Release* 2023, 353: 1096 – 1106.
46. PARK KY, HAN HS, PARK JW, et al. Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of dupilumab-related facial redness in patients with atopic dermatitis: A report of two cases. *J Cosmet Dermatol* 2022, 21 (2): 844 – 849. DOI: 10.1111/jocd.14153
47. JANOCKOVA J, HARVANOVA L, SPAKOVA T, et al. New therapeutic approaches of mesenchymal stem cells-derived exosomes. *J Biomed Sci* 2021, 28: 39. DOI: 10.1186/s12929-021-00736-4
48. CARLSSON PO, SCHWARCZ E, KORSGREN O, et al. Preserved beta-cell function in type 1 diabetes by mesenchymal stromal cells. *Diabetes* 2015, 64: 587 – 592.
49. SHARMA R, KUMARI M, et al. Exosomes Secreted by Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cell Attenuate Diabetes in Mice. *J Diabetes Res* 2021, 9534574.
50. FAN B, LI C. SZALAD A, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 2020, 63: 431 – 443.
51. SUN Y, SHI H, YIN S, et al. Human Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Alleviate Type 2 Diabetes Mellitus through Reversing Peripheral Insulin Resistance and Relieving β -Cell Destruction. *ACS Nano* 2018, 12 (8): 7613 – 7628. DOI: 10.1021/acsnano.7b07643
52. HUEY KA. Potential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor During Skeletal Muscle Hypertrophy. *Exerc Sport Sci Rev* 2018, 46 (3): 195 – 202.
53. WENCHUN QW, WANG Z, ENGELBERG-COOK E, et al. Efficacy and Safety of MSC Cell Therapies for Hospitalized Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis *Stem Cells Translational Medicine* 2022, 11: 688 – 703.
54. LENER T, GIMONA M, AIGNER L, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – An ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 2015, 4: 30087. DOI: 10.3402/jev.v4.30087.

Do redakcie došlo 2. 2. 2023.

Adresa pre korešpondenciu:
Doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc.
 Onkologický ústav sv. Alžbety
 Heydukova 10
 812 50 Bratislava
 E-mail: juraj.kausitz@ousa.sk