

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

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



**Eva Karásková**

**Vliv stresových hormonů na mezenchymální kmenové buňky**

**Effect of stress hormones on mesenchymal stem cells**

Bakalářská práce

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

Praha, 2019

## **Prohlášení**

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

V Praze, 1.5. 2019

Eva Karásková

## **Poděkování**

Předně bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a komentáře při psaní této bakalářské práce. Další poděkování patří Bc. RNDr. MUDr. Monice Červinkové, Ph.D. za její konzultaci a rady. Na závěr chci poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě během celého studia a psaní této práce podporovali.

## Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou multipotentní buňky se schopností diferenciovat do osteoblastů, adipocytů a chondrocytů. V organismu se podílejí na udržování homeostáze, hojení ran a regeneraci tkání. Nejčastěji bývají izolovány z kostní dřene či tukové tkáně a jsou studovány především v oblasti regenerativní medicíny. Stresová reakce je neuro-humorální příprava na „boj nebo útěk“, jde tedy o obranou reakci na zátěž, a to jak fyzickou, tak psychickou. Dlouhodobý stres má však na organismus negativní vliv a dochází k jeho postupnému vyčerpávání a poškozování. Hypotéza je taková, že působením stresových hormonů a neurotransmiterů na MSCs dochází ke zhoršení udržování vnitřní homeostáze a integrity organismu, zpomalení hojení a regenerace tkání. Stresové hormony ovlivňují vlastnosti a chování MSCs, především jejich schopnost diferenciaci, migraci do míst poranění a produkci aktivních látek.

**Klíčová slova:** mezenchymální kmenové buňky (MSCs), katecholaminy, hormony, nervový systém, stres

## Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells with the capacity to differentiate into cell lineages such as osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. They maintain homeostasis in organism and contribute to wound healing and tissue regeneration. Usually, they are isolated from bone marrow or adipose tissue and they are primarily studied in regenerative medicine. Stress reaction is neurohumoral preparation for “fight or flight”, that occurs in response to physical or mental stressors. However, chronic stress has a negative impact on organism; it causes gradual exhaustion and damage in the whole body. Main hypothesis of this study is that stress hormones and neurotransmitters affect MSCs, which subsequently results in disturbed homeostasis and integrity of organism, delayed wound healing and attenuated tissue regeneration. Stress hormones influence quality and function of MSCs, especially their capabilities of differentiation, migration to wounded tissue and production of bioactive molecules.

**Key words:** mesenchymal stem cells (MSCs), catecholamines, hormones, dopamine, nervous system, stress

## Seznam zkratek

MSCs: mesenchymal stem cell, mezenchymální kmenové buňky

CFU-Fs: colony-forming unit fibroblasts, jednotky buněk tvořící kolonie

TLRs: toll-like receptory

GvHD: graft-versus-host disease, reakce štěpu proti hostiteli po transplantaci kostní dřeně

HSCT: hematopoietic stem cell transplantation, transplantace kostní dřeně

SNS: sympatetický nervový systém

PLC: fosfolipáza C

PIP<sub>2</sub>: fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

DAG: 1,2-diacylglycerol

IP<sub>3</sub>: inositol-1,4,5-trifosfát

AC: adenylát cykláza

HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hypothalamo-pituitárně-adrenální osa

ADH: antidiuretický hormon, vazopresin

DHEA: dehydroepiandrosteron

CRH: corticotropin-releasing hormone, kortikoliberin

ACTH: adrenocorticotropine hormone, adrenokortikotropin

GAS: general adaptation syndrome, adaptační syndrom

IBS: irritable bowel syndrome, syndrom dráždivého tračníku

HBM-MSCs: human bone marrow mesenchymal stem cells, lidské mezenchymální kmenové buňky kostní dřeně

CPC: cartilage progenitor cell, progenitorové buňky chondrocytů

BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; mezenchymální kmenové buňky kostní dřeně

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridin

# Obsah

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>2</b>
<b>3. MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY.....</b>	<b>3</b>
3.1 ÚVOD.....	3
3.2 CHARAKTERISTIKA.....	3
3.3 VLASTNOSTI .....	5
3.4 VYUŽITÍ A MOŽNÉ KOMPLIKACE .....	6
<b>4. HORMONY, NEUROTRANSMITERY A RECEPTORY .....</b>	<b>7</b>
4.1 KATECHOLAMINY.....	8
4.2 GLUKOKORTIKOIDY .....	9
4.3 DALŠÍ HORMONY .....	10
<b>5. STRES.....</b>	<b>11</b>
5.1 PSYCHOLOGICKÝ POHLED .....	11
5.2 FYZIOLOGICKÝ POHLED .....	12
5.3 STRES A JEHO VLIV NA ZDRAVÍ .....	14
<b>6. VLIV STRESOVÝCH HORMONŮ NA MEZENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY .....</b>	<b>16</b>
6.1 ÚVOD.....	16
6.2 RECEPTORY NA MSCs.....	16
6.3 KATECHOLAMINY.....	17
6.3.1 <i>Adrenalin, noradrenalin</i> .....	17
6.3.2 <i>Dopamin</i> .....	19
6.4 GLUKOKORTIKOIDY .....	21
6.4 DALŠÍ HORMONY .....	22
6.5 NAVOZENÝ CHRONICKÝ STRES .....	23
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>25</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>26</b>

# 1. Úvod

Je známá celá řada mechanismů, při kterých stres negativně působí na udržování stálého vnitřního prostředí, integrity organismu a regeneraci tkání.

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) se také podílejí na regeneraci organismu. Vyskytují se téměř u každého orgánu a slouží jako zásobárna progenitorů nejen mezodermálních buněčných typů. Vlivem endogenních faktorů a stimulů okolního prostředí tyto buňky diferenciují a nahrazují tak poškozené buňky a buňky podléhající senescenci. Během stresu je organismus vystaven zvýšené dávce stresových hormonů, které primárně slouží k přípravě na fyzickou a psychickou zátěž. Při dlouhodobém stresu jsou však zátěží pro organismus právě zvýšené hladiny hormonů, které začnou organismus postupně vysilovat. Lze předpokládat, že MSCs budou reagovat na zvýšené hladiny hormonů a tím měnit své vlastnosti včetně schopnosti diferenciaci.

MSCs mají své nezastupitelné místo v regenerativní medicíně, a to především díky možnosti autologní transplantace. Poznáním mechanismů snížené regenerace a hojení ran vlivem stresu na MSCs by mohlo vést k navržení nových buněčných terapií.



## 2. Cíl práce

Cílem této práce je formou literární rešerše shrnout vliv stresu a faktorů produkovaných při stresové odpovědi na vlastnosti a funkci MSCs. Náplní první části práce je obecná charakteristika MSCs, stresových hormonů, neurotransmiterů a stresové odpovědi. Druhá část práce je zaměřena na vlivy těchto endogenních látek na MSCs. Cílem práce je popsání mechanismů některých sledovaných dějů a vyzdvižení konkrétních studií, které se těmito vlivy zabývají, především ve spojitosti s regenerací organismu a využití MSCs v buněčné terapii.

## 3. Mezenchymální kmenové buňky

### 3.1 Úvod

Mezenchymální kmenové buňky jsou nehematopoetické buňky kostní dřeně schopné diferenciovat se do několika buněčných linií, a to jak mezodermálního, tak nemezodermálního původu [1]. První zmínky a teoretické úvahy o existenci takových buněk se schopností opustit kostní dřeň a pohybovat se v periferní krvi po celém těle, vyslovil v roce 1857 německý patolog Cohnheim, jak je shrnuto v práci zabývající se historií studia MSCs [2]. Během následujících sta let vědci navázali a pokračovali v Cohnheimově teorii. Velký průlom nastal až v sedmdesátých letech 20. století, kdy Alexander Friedenstein přinesl první důkaz přítomnosti buněk v kostní dřeni, které se nepodílí na krvetvorbě a jsou význačné pro svoji schopnost sebeobnovy. Od této doby se výzkum MSCs posouval neustále dál, a to hlavně v uplynulých letech. Terapeutické využití MSCs při regenerativní medicíně a imunoterapii se přímo nabízí, a proto neustále přibývají vědecké práce zabývající se touto problematikou.

### 3.2 Charakteristika

Při definování MSCs se pohlíží na několik faktorů. Buňky musí tvořit kolonie (colony-forming unit fibroblast – CFU-Fs), tj. být plastické a adherentní, na svém povrchu exprimovat antigeny CD44, CD73, CD90 a CD105, zároveň být negativní na CD14, CD11b, CD19, CD34, CD45, CD79, HLA-DR a musí mít schopnost diferenciovat se do chondroblastů, adipocytů a osteoblastů *in vitro*. Toto jsou pouze minimální kritéria pro rozlišení MSCs [3].

MSCs se pohybují v periferní krvi, v těle je nejčastěji nalezneme zachycené ke kapilárám v perivaskulárním prostoru téměř u každého orgánu v těle. Fenotypově se tak velmi podobají pericytům, tedy buňkám s výběžky, které obklopují krevní kapiláry.

Pericyty spolu s buňkami hladké cévní svaloviny, buňkami imunitního systému, fibroblasty a endoteliálními buňkami, jsou součástí stromální vaskulární frakce. S MSCs mají společných několik znaků: plasticitu, absenci hematopoetických markerů a potenciál diferenciací. Pericyty a buňky hladké cévní svaloviny se mohou chovat jako MSCs, záleží však na typu

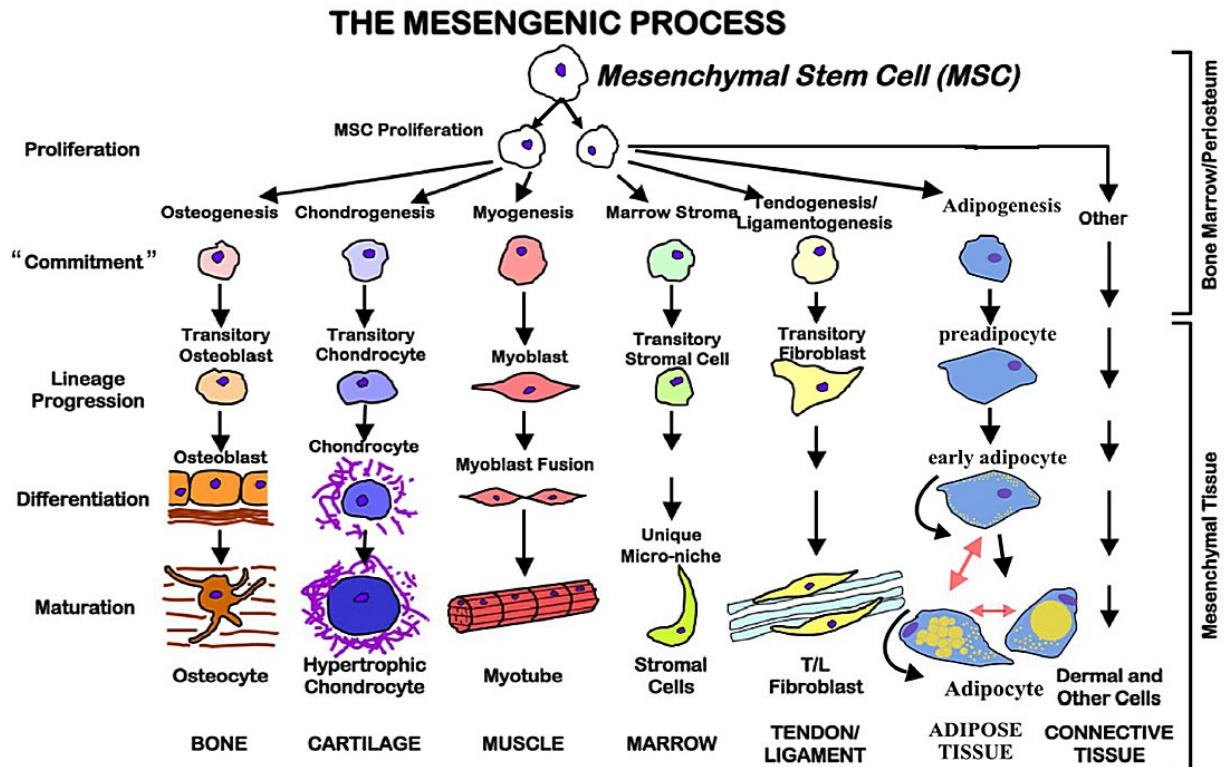
orgánu, v jehož blízkosti se nacházejí. Rozdíl je taktéž při pozorování schopnosti diferenciaci *in vivo* a *in vitro*. *In vivo* si pericyty zachovávají identitu tkáně, ze které pocházejí, a nedělí se do dalších linií [4].

Velkou homologii vykazují MSCs taktéž s fibroblasty. Fibroblasty jsou plastické adherentní buňky, které se podílejí na vývoji, regulaci a opravě tkání, nediferencují se však na jiné buněčné typy. Na rozdíl od MSCs jsou považovány za terminálně diferenciované. Hlavní vlastnosti, podle kterých můžeme fibroblasty od MSCs odlišit, jsou potenciál diferenciaci a tvorba CFU-Fs [5].

Jedním z hlavních zdrojů MSCs je kostní dřev a tuková tkáň, ze které lze buňky snadno izolovat. Dále byly úspěšně izolovány z pupečníku, pupečnickové krve, Whartonova rosolu, amniotické tekutiny, placenty, dentální pulpy, endometria, menstruační krve a kůže [6].

MSCs diferenciují do osteoblastů, chondroblastů a adipocytů (viz Obr.1). MSCs mohou diferenciovat také do kardiomyocytů, myocytů, do buněk šlach a vazů. Potvrzeny jsou dokonce linie endodermální a ektodermální (hepatocyty, pankreatické insulin  $\beta$ -buňky, pigmentové buňky sítnice, nervové a kožní buňky, renální tubuly) [7]. Při studiu diferenciaci *in vitro* byla navozena adipogeneze 1-methyl-3-isobutylxantinem, dexametazonem, insulinem a indometacinem; chondrogenese TGFB3 (transformující růstový faktor  $\beta$ 3) a osteogeneze dexametazonem a  $\beta$ -glycerolfosfátem. Při diferenciaci *in vivo* se uplatňuje několik vlivů: výživa, mechanické síly, hustota buněk, prostorová organizace, růstové faktory, cytokiny. I samotné buňky vytvářejí autokrinní a parakrinní faktory, které jsou důležité pro další vývoj [8].

MSCs migrují v těle do míst poranění, kde se podílí na regeneraci tkání. Exprimují např.: cytokiny, chemokiny, adhezivní molekuly, integriny, toll-like receptory (TLRs), CXC a CC receptory, leukotrieny, prostaglandiny, různé enzymy, kyselinu hyaluronovou, volné radikály a mnoho dalších faktorů, které se účastní chemotaxe a migrace [9].



Obrázek 1: Diferenciace mezenchymálních kmenových buněk [10].

### 3.3 Vlastnosti

MSCs se podílejí na regulaci a udržování homeostázy hematopoetického prostředí v kostní dřeni. Udržují rovnováhu mezi sebeobnovou a diferenciací křvetvorných buněk. Regulace probíhá na úrovni přímých buněčných kontaktů, skrz růstové faktory, cytokiny, chemokiny a molekuly extracelulární matrix [11].

MSCs jsou důležité pro regeneraci orgánů a tkání. Vyskytují se v blízkosti orgánů, kde slouží jako nejbližší zdroj buněk pro obnovu tkáně. MSCs jsou schopné diferenciovat do buněčného typu příslušného orgánu a tím nahradit buňky poškozené a senescentní [12].

Významnou vlastností MSCs jsou jejich imunomodulační schopnosti a tvorba bioaktivních látek. Dokáží ovlivnit komponenty jak vrozené, tak adaptivní imunity, a to přímým buněčným kontaktem, sekrecí cytokinů, případně kombinací obojího. Vlivem prostředí jsou schopny změnit svůj fenotyp a stát se buňkami s prozánětlivým účinkem (tzv. typ MSC1), nebo na buňky s protizánětlivým účinkem (tzv. typ MSC2). Populace MSC2 indukovaná v přítomnosti IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  podporuje vznik Tregs (T regulační lymfocyty) [13].

MSCs ovlivňují aktivitu i dalších buněk imunitního systému (neutrofilů, NK buňky, dendritické buňky a B lymfocyty). MSCs mohou snižovat životaschopnost a diferenciaci imunitních buněk, nebo naopak aktivovat a podpořit proliferaci [14].

MSCs sekretují řadu bioaktivních látek, např.: IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , CCL2/MCP1, CCL-5/RANTES,IDO, VEGF (vascular endothelial growth factor), ICAM (intercellular adhesion molecule), PGE2. Sekrece probíhá buď spontánně, či po stimulaci IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  [15].

### 3.4 Využití a možné komplikace

O využití MSCs se začíná v posledních letech stále více diskutovat. Čím více se doplňují informace o chování MSCs, tím se ukazuje větší potenciál pro využití v praxi. Migrace k místu zánětu, schopnost diferenciaci do několika linií, imunosupresivní vlastnosti a produkce molekul, např. VEGF, to je hlavní náplň studií v oboru regenerativní medicíny. Hojení a regenerace chronických ran pomocí MSCs a kmenových buněk je studována [16], výsledky studií bývají stále častěji úspěšnější a dochází ke zlepšování metod. Podání MSCs s sebou nese však možná rizika. Po aplikování MSCs intravenózně může docházet k transmigraci a usazování MSCs nespecificky v orgánech [17]. Také není stále jisté, jaká je jejich životnost v těle, případně jak velké riziko vzniku rakoviny může nastat. Nádor v těle se chová jako chronický zánět, buňky imunitního systému a MSCs jsou k němu přirozeně atrahovány [18]. Působením okolního prostředí by tak mohly podporovat růst a vývoj nádoru [19].

Na druhou stranu, MSCs jsou studovány a využívány v genové terapii v boji s rakovinou. Jejich tendence migrovat do místa nádoru by se dala využít. Geneticky upravené MSCs by eventuálně mohly sloužit k cílené likvidaci nádoru a metastáz v těle, jelikož by samy doputovaly do míst nádoru [20].

Autoimunitních onemocnění v posledních letech neustále přibývá. Jedna z diskutovaných možností léčby je právě pomocí MSCs. Imunomodulační vlastnosti MSCs jsou studovány zejména v souvislosti s těmito nemocemi: Crohnova choroba [21], revmatoidní artritida [22], roztroušená skleróza [23], systémový lupus erythematosus [24]. Dalším velmi diskutovaným užitím MSCs a kmenových buněk obecně, je aplikace při léčbě *Diabetes mellitus*. Jedná se o autoimunitní onemocnění, během kterého dochází k destrukci

pankreatických  $\beta$  buněk, které tvoří hormon insulin. Cílem je vytvořit z kmenových buněk funkční a stabilní  $\beta$ -like buňky, které by byly schopny chybějící hormon tvořit a udržovat tak stálou hladinu glykemie. Velice výhodná je možnost autologní transplantace a snadná izolace MSCs, např. z tukové tkáně. Takto upravené buňky schopné tvořit insulin by poskytovaly dlouhodobé řešení a relativně ustálenou tvorbu insulinu bez nutnosti hledání dárce [25].

MSCs mohou být využity i v oblasti transplantací. Příkladem může být reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GvHD), komplikace po transplantaci kostní dřeně (hematopoietic stem cell transplantation – HSCT), kdy transplantované buňky rozeznají tělo příjemce jako cizí a napadnou jej. Pacientům jsou při léčbě akutní GvHD podávány kortikosteroidy. Po aplikaci MSCs po HSCT se zmírňují příznaky GvHD, taktéž dochází k prodloužení doby přežití pacientů. Ovšem ne ve všech případech dochází ke zlepšení. Samotná aplikace MSCs s sebou nese výhody i rizika, momentálně probíhá několik klinických studií zabývajících se vylepšením protokolů podání MSCs [26].

Schopnost MSCs diferenciovat se do několika buněčných typů se přímo nabízí pro léčbu a regeneraci orgánů. Častým příkladem je jejich využití při akutním selhání jater či ledvin. Většina dosavadní léčby těchto stavů je zaměřena pouze na zabránění komplikací a snižování progresu onemocnění. Nejúčinnější léčbou je transplantace orgánu, která se ale neobejde bez rizik. Ohledně diferenciací MSCs do hepatocytů *in vivo* a *in vitro* působením růstových a jiných faktorů se vedou diskuse. V tomto ohledu je stále dosti nejasností. Několik výzkumů uvádí pozitivní výsledky po podání samotných MSCs, některé studie navrhují transplantaci konkrétních progenitorů. Pokud by se v následujících letech podařilo vyřešit nedostatky, jednalo by se o velmi elegantní způsob léčby [27].

Výhod použití MSCs při klinické aplikaci je několik, stále je však nutné prověřit možné vedlejší účinky a osud MSCs v těle. Lze předpokládat, že v průběhu příštích let ovládnou MSCs regenerativní medicínu a tkáňové inženýrství, a budou součástí stálé léčby mnoha onemocnění.

## 4. Hormony, neurotransmitery a receptory

### 4.1 Katecholaminy

Katecholaminy jsou hormony odvozené od tyrozinu, které jsou produkovány v sympatickém nervovém systému a dřeni nadledvin. Řadíme sem dopamin, noradrenalin a adrenalin. Slouží jako neurotransmitery. Po syntéze v dřeni nadledvin se dostávají do krevního oběhu a ovlivňují buňky s adrenergními receptory. V případě produkce v sympatickém nervovém systému (SNS), dojde k uvolnění v blízkosti efektorové buňky z axonu. Katecholaminy mohou být syntetizovány i lokálně. Produkce adrenalinu byla prokázána např. buňkami imunitního systému či u keratinocytů v kůži [28][29]. Účinek katecholaminů závisí na navázání na jeden či více adrenergních receptorů, které způsobí buď vazokonstrikci, či vazodilataci cév na příslušných místech. Také regulují metabolickou aktivitu buněk.

Adrenergní receptory jsou membránové receptory spřažené s G proteiny. Rozlišujeme dvě třídy, a sice  $\alpha$  a  $\beta$ -adrenergní receptory.  $\alpha$ -adrenergní receptory dále dělíme do dvou kategorií podle působení na G spřažený protein;  $\alpha_1$ , spřažené s  $G_q$  proteinem ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) a  $\alpha_2$ , spřažený s  $G_i$  proteinem ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ).  $G_q$  přenáší signál na fosfolipázu C (PLC), která štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>) na 1,2-diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (IP<sub>3</sub>). Tito druzí posílají ovlivňují intracelulární koncentraci Ca<sup>2+</sup> a tím transdukcí signálu.  $G_i$  protein řídí funkci adenylát cyklázy (AC), která je inaktivována a dochází ke snížení koncentrace cAMP.  $\beta$ -adrenergní receptory rozlišujeme na  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , které jsou spřažené s  $G_s$  proteinem,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  pak také s  $G_i$  proteinem. Efektorovým proteinem  $G_s$  je také AC, která je ale aktivována a zvyšuje koncentraci cAMP. Jednotlivé katecholaminy vykazují odlišnou afinitu k jednotlivým receptorům. Noradrenalin se váže nejvíce na alfa receptory, adrenalin stimuluje rovnoměrně alfa i beta.

Při léčbě onemocnění kardiovaskulárního systému se používají tzv. beta-blokátory. Beta-blokátory se váží antagonisticky na  $\beta$ -adrenergní receptory a tlumí účinek sympatického nervového systému. O jejich vlivu a vedlejších účincích při léčbě se vede řada diskusí, v posledních letech navíc přibývají studie o působení beta-blokátorů na hojení ran [28]. V medicíně se také využívají tzv. sympatomimetika, agonisté alfa a beta receptorů. Jsou to látky, které napodobují podráždění SNS. Používají se např. při resuscitaci, šoku a u astmatiků.

Mezi další receptory katecholaminů patří dopaminové receptory, které dělíme do dvou tříd. D1R receptory (D1-like, D5-like), které aktivují AC působením  $G_s$  proteinu a zvyšují koncentraci cAMP; D2R receptory (D2-like, D3-like, D4-like) které působí opačným účinkem, tedy inhibují AC skrz  $G_{0/i}$  protein a dochází ke snížení cAMP. Navázání agonisty či antagonisty na určitý typ receptoru je zásadní pro vyvolání specifické odpovědi. Signál nemusí být předáván pouze přes aktivitu AC. Možný je i přenos přes tyrosin kinázové receptory [30].

Antagonisté dopaminu se využívají jako antipsychotika. Antipsychotika jsou látky, které slouží při léčbě psychotických onemocnění, např. schizofrenie, maniodepresivní psychózy či halucinací. Využívají se také agonisté a to např. při léčbě Parkinsonovy nemoci [31].

## 4.2 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou steroidní hormony, které jsou tvořeny spolu s androgeny v *zona fasciculata* v kůře nadledvin. Sekrece glukokortikoidů je řízena hypothalamo-pituitárně-adrenální osou (hypothalamic-pituitary-adrenal axis – HPA). V krvi jsou navázány na transportní proteiny (transkortin, CBG), putují krevním řečištěm, pronikají skrz cytoplazmatickou membránu a váží se na intracelulární glukokortikoidové receptory. Ovlivňují fyziologické procesy, především metabolismus glukózy, regulaci krevního tlaku, imunitní a zánětlivou odpověď organismu a mentální funkce. Mezi nejvýznamnější patří lidský kortizol, kterému se u hlodavců říká kortikosteron. Glukokortikoidy mají inhibující efekt na B a T lymfocyty, fagocyty, ovlivňují vrozenou i získanou imunitu, snižují produkci prozánětlivých cytokinů, a proto se hojně využívají v léčbě autoimunitních onemocnění nebo při alergických reakcích. Glukokortikoidy mají však mnoho vedlejších účinků, např. vznik osteoporózy, nárůst na váze, zvýšené riziko infekcí, hyperglykémie a další [32].

Rozlišujeme glukokortikoidové receptory a mineralkortikoidové receptory. Glukokortikoidové receptory jsou jaderné receptory fungující jako transkripční faktory, které indukují, či tlumí expresi cílených genů v buňce. Oba typy receptorů se vyskytují v mozkových tkáních, nejvíce v limbickém systému, váží stejné hormony, ale každý s jinou afinitou; mineralkortikoidové receptory vykazují vyšší afinitu ke kortikosteronu než glukokortikoidové receptory. Glukokortikoidy se rovněž podílejí na regulaci HPA osy, neurogenezi některých částí mozku a ukládání stresových zážitků do paměti [33].



### 4.3 Další hormony

Významné je i působení dalších stresových hormonů a sice vazopresinu (ADH), oxytocinu a dehydroepiandrosteronu (DHEA), prekurzor testosteronu a estradiolu. ADH a oxytocin jsou hormony syntetizované v hypothalamu (*nucleus paraventricularis* a *nucleus supraopticus*), odkud jsou dále transportovány do neurohypofýzy. Hlavní funkce ADH je regulace vody a elektrolytu v těle, během stresové odpovědi ovlivňuje HPA osu a spolu s kortikoliberinem (CRH) řídí sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Oxytocin je důležitý zejména při porodu a laktaci, dále se účastní neuroendokrinní regulace a změn v chování (v závislosti na pohlaví a koncentraci glukokortikoidů) [34] [35].

DHEA je tvořen v kůře nadledvin v *zona reticularis*. Během stresu je uvolňován spolu s kortizolem působením ACTH [36].

## 5. Stres

### 5.1 Psychologický pohled

Pojem „stres“ je v dnešní době velice využívané, možná až zneužívané slovo. Co původně znamená? Stres je jakékoliv vychýlení a narušení homeostázy v těle organismu působením stresorů, při kterém dochází k navození adaptivních procesů, které vedou k behaviorálním a fyziologickým změnám. Homeostáza je stálé vnitřní prostředí; tento termín vyslovil v roce 1926 americký fyziolog Walter Bradford Cannon. Ve své knize „Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage“ (1915) jako první popisuje reakci „flight or fight“, tedy „útok nebo útek“, kdy organismus na základě vyhodnocení přijímaných podnětů odpoví na danou situaci, aby se „zachránil“ [37]. V roce 1975 Hans Selye rozdělil stres na eustres a distres. Eustres je tzv. pozitivní zátěž, optimální hladina stresu, která motivuje a přispívá k lepším výkonům, naopak distres je negativní zátěž, chronický stres, který má na organismus negativní vliv. Stres může být akutní, trvající v řádu několika minut, hodin, nebo naopak chronický, dlouhodobý, který trvá několik dní, měsíců a je pro organismus škodlivý.

Stresory jsou podněty, které vyvolávají stres. Mohou to být podněty fyzické, psychické, sociální, traumatické. Ať už se jedná o určitou událost, prožitek, vzpomínku, důležité je, že každý jedinec reaguje na stejný stresor jiným způsobem. T. H. Holmes a R. H. Rahe v roce 1967 vytvořili tzv. škálu stresu, kdy jednotlivým událostem přiřadili na základě studií určitý počet bodů. Pokud jedinec nasbírá během roku více než 300 bodů, je téměř jisté, že se to negativně odrazí na jeho zdravotním stavu. Vytvořená škála stresu vyvolala vlnu nesouhlasu v odborné veřejnosti, byla i několikrát upravována. Stále však platí, že reakce na stresory a události v životě jsou subjektivním vjemem a jsou závislé na předchozích zkušenostech.

Zvládání stresu je velice individuální. Nejjednodušším způsobem je odstranit příčiny stresu, to ale není vždy možné. Coping (kopink) je mechanismus, jak se vyrovnat se stresovou situací, a to jak vědomě, tak nevědomě. Některé situace mohou vyvolávat pocit ohrožení, některé naopak pocit výzvy. Hlavním cílem copingu je navodit obranné mechanismy tak, aby se zabránilo úzkosti. Mezi hlavní strategie patří: vytěsnění, racionalizace, reaktivní formace, projekce, intelektualizace, popření, a sublimace.

## 5.2 Fyziologický pohled

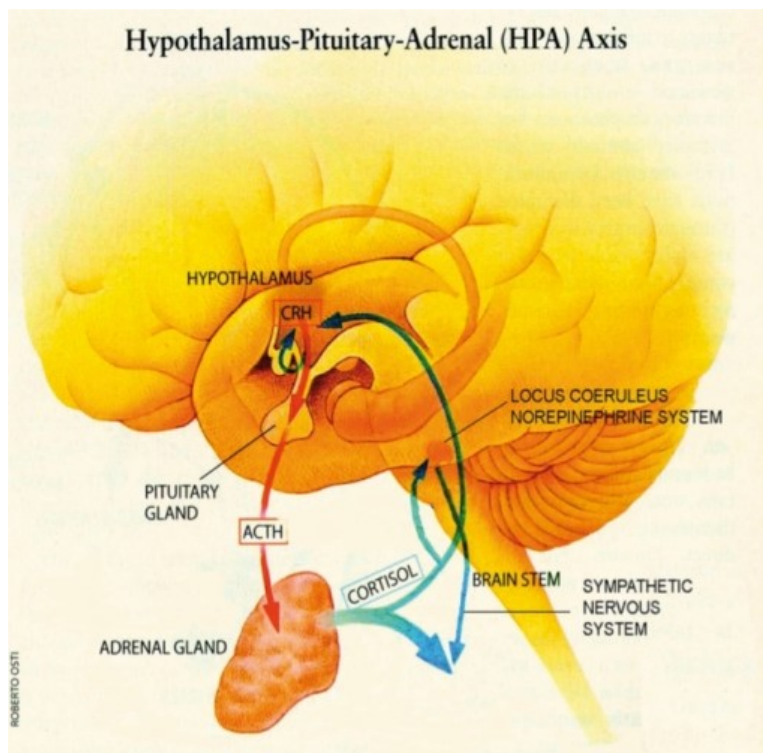
Generalizovaný adaptační syndrom (general adaptation syndrome – GAS) popsal v roce 1950 Hans Selye. GAS označuje tři stupně biologických reakcí na stres. První fáze poplachová, druhá fáze rezistence a třetí fáze vyčerpání.

*Nucleus raphe* a *nucleus coeruleus* tvoří základ behaviorálního inhibičního centra v mozku, kde dochází k vyhodnocení stupně nebezpečí na základě přijímaných podnětů a signálů. V případě posouzení situace jako ohrožující, dojde k nástupu první fáze GAS, tedy fáze poplachové (nazývána také Cannonovská).

Noradrenalin v těle navodí tzv. nabuzení (arousal). Dochází k aktivaci sympatické části vegetativního nervstva, která začne stimulovat dřeň nadledvin k produkci adrenalinu i noradrenalinu. Adrenalin a noradrenalin putují v krevním oběhu, váží se na adrenergní receptory, které se nachází na většině buňkách a navozují u nich změny. Dochází ke zvýšení krevního tlaku, vzestupu tepové frekvence, zrychlení dechu, pocení a dalších tělesných jevů. Během této fáze se tvoří a narůstá v těle množství katecholaminů, glukokortikoidů, mineralkortikoidů, zvyšuje se glykogenolýza, lipolýza, proteokatabolismus.

Postupně nastupuje fáze rezistence, která je kontrolována HPA osou (viz Obr.2). Dochází k podráždění paraventriculárního jádra hypothalamu, který začne produkovat CRH hormon a ADH, který působí na hypofýzu. Hypofýza vlivem CRH začne produkovat ACTH, který ovlivní kůru nadledvin a ta začne produkovat glukokortikoidy, především kortizol. Glukokortikoidy se váží na receptory v buňkách a vyvolané změny připravují organismus na komplexní odpověď na stres, zároveň působí negativní zpětnou vazbou na hypothalamus. V této fázi se opět navýší koncentrace glukokortikoidů a dochází ke glukoneogenezi [38].

Fáze vyčerpání nastává působením dlouhodobého stresu. Adaptivní reakce selhávají, rezervy jsou vyčerpány a organismus nezvládá produkovat tolik energie, kolik je potřeba. Tuto poslední fázi řídí adrenergní systém i HPA osa.



Obrázek 2: HPA osa. Po vyhodnocení situace v locus coeruleus dojde k uvolnění noradrenalinu a aktivaci sympatiku. Dochází k podráždění paraventriculárního jádra hypothalamu, který začne produkovat CRH a ten stimuluje hypofýzu k produkci ACTH. ACTH indukuje produkci glukokortikoidů v kůře nadledvin. Glukokortikoidy působí negativní zpětnou vazbou na hypothalamus a produkci CRH [39].

Na stres reagují především určité části mozku, které se dále podílejí na regulaci odpovědi. Jsou to: prefrontální kortex, amygdala, hippocampus a *nucleus accumbens*. V těchto strukturách dochází vlivem stresorů ke změnám v extracelulární koncentraci neurotransmiterů (acetylcholin, dopamin, glutamát, GABA), které ovlivňují behaviorální změny zajišťující coping; taktéž působí v řízení HPA osy. K aktivitě nedochází jen v samostatných částech mozku, ale probíhá neustálá komunikace mezi jednotlivými oblastmi mozku právě díky neurotransmiterům.

Glukokortikoidy, které vznikají během stresové odpovědi, taktéž interagují s neurotransmitery v mozku, zejména ve výše zmíněných limbických oblastech. Podílejí se na jejich regulaci, aktivitě a jsou spojovány spolu s neurotransmitery, prefrontálním kortexem, amygdalou a hippocampem jako důležité složky podílející se na regulaci působení stresu na paměť [40].

### 5.3 Stres a jeho vliv na zdraví

Je známo, že pokud je jedinec dlouhodobě vystaven stresu, bývá nezdědka poškozeno i jeho zdraví. Mezi projevy patří např. snížená imunita, problémy se srdcem, zažíváním, nádorové bujení, vysoký krevní tlak apod.

Akutní stres, krátkodobý, trvajícím v řádu minut, maximálně hodin, je vnímán jako pozitivní. V průběhu akutního stresu dojde k rychlému nastartování neuroendokrinních, kardiovaskulárních a muskuloskeletárních systémů, také dojde ke zlepšení a posílení imunity, a to jak vrozené, tak adaptivní. Pravděpodobná příčina je spojena s tzv. obrazem „lva a gazely“, tedy „bojem nebo útekem“. Stres a adrenalin zvýší lvu šanci gazelu ulovit, a naopak gazele utéci před lvem, případně přežít možná zranění a rány. Právě při zesílené imunitní odpovědi se organismus lépe vypořádá se zraněním a možnými infekcemi. Dochází ke zlepšené distribuci leukocytů v těle, efektivnější imunitní odpovědi, zvýšení aktivity imunitního dohledu a navýšení protitumorogenních obranných mechanismů.

Naopak při stresu dlouhodobém, chronickém, nastává imunosuprese a dysregulace imunitního systému. Ovlivněna je aktivita imunitních buněk, jejich proliferace, odpověď T lymfocytů na patogeny, protinádorová imunita a další [41]. Chronický stres má vliv i na tzv. imunosenescenci, tedy stárnutí imunitních buněk. U žen, které byly vystaveny chronickému stresu, bylo zjištěno zkrácení telomer u lymfocytů a monocytů [42]. Stres koreluje také s výskytem kardiovaskulárních chorob, které jsou častější u žen, ačkoliv u mužů je vyšší mortalita. Muži reagují na stres většinou zvýšením systolického tlaku, zatímco ženám se zvyšuje tep [43]. Je několik teorií, jak samotné pohlaví ovlivňuje výslednou odpověď na stres, a to jak z psychologického, tak z fyziologického hlediska. Jedním z pravděpodobných důvodů tohoto rozdílu je odlišnost v množství pohlavních hormonů a především estrogenů.

Za zmínku stojí bezpochyby vliv stresu na gastrointestinální soustavu a s ním především syndrom dráždivého tračníku (irritable bowel syndrome – IBS) a další funkční dyspepsie. Samotná příčina vzniku IBS je spojována s vysokou hladinou stresu; provázanost různých stresových událostí na samotné zlepšení, či zhoršení symptomů onemocnění je zcela evidentní [44].

Dysregulací určitých cytokinů může docházet také k ovlivnění hojení ran. U lidí, kteří jsou vystaveni stresu, dochází ke zpomalení hojení a prodloužení doby léčby [45].

Zmíněné příklady jsou pouze malou ukázkou toho, jak je stresová odpověď komplexní. Jednotlivé mechanismy jsou mezi sebou různě propojené a společným působením vytváří mnohdy ne příliš chtěné následky. Neurotransmitery a hormony mají efekt na každou buňku v našem těle, avšak jen těžce nacházíme přímá spojení a dráhy regulací takto složitých vazeb.

## 6. Vliv stresových hormonů na mezenchymální kmenové buňky

### 6.1 Úvod

Hlavní funkce stresové odpovědi je zajištění přežití organismu. Během stresu a působením stresorů vzrůstá koncentrace katecholaminů, glukokortikoidů a dalších látek, které pomáhají připravit organismus na zátěž. Při dlouhodobě zvýšené koncentraci těchto látek se organismus vyčerpává a dochází k narušení jeho funkčnosti. Regulační mechanismy těla, udržování homeostázy a předávání informace probíhá především skrz informační molekuly neuroendokrinního systému.

MSCs jsou důležité buňky zajišťující regeneraci tkání a hojení ran. Na svém povrchu exprimují mnoho receptorů pro nejrůznější signální molekuly, a tedy i pro stresové hormony a neurotransmitery. Lze předpokládat, že dlouhodobé působení stresu bude mít přímý či nepřímý vliv na MSCs a tedy samotnou regeneraci organismu.

V dnešní době se příliš neklade důraz na mentální a psychický stav pacienta. Avšak téměř u všech pacientů je součástí léčby právě chronický stres, který ovlivňuje průběh léčby. Stres a strach jako negativní emoce vyvolávají látkové změny v těle, mění neuroendokrinní regulaci a díky uvolněným hormonům dochází k nejrůznějším změnám v organismu. Studování změn vlastností MSCs účinkem katecholaminů a glukokortikoidů by tak mohlo být zásadní pro pochopení reakcí v organismu, které mohou po použití MSCs při nejrůznějších buněčných terapiích nastat a podstatně ovlivnit výsledky klinických studií a průběh léčby.

### 6.2 Receptory na MSCs

Adrenergní receptory váží katecholaminy SNS. Většina buněk tyto receptory má a MSCs nejsou výjimkou. SNS se podílí se na regulaci a udržování homeostázy hematopoietické niky [46]. Na základě průtokové cytometrie byly potvrzeny  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  receptory na povrchu MSCs izolovaných z tukové tkáně [47]. Tuková tkáň a MSCs byly odebrány od 10 různých dárců. Bylo prokázáno, že množství a exprese adrenergních receptorů je odlišné u každého jedince. Po následné stimulaci noradrenalinem došlo ke zvýšení exprese  $\alpha_{1A}$ -adrenergních receptorů, zároveň došlo ke snížení  $\beta$ -adrenergních receptorů, které zprostředkovávají transdukcí signálu cAMP dependentní cestou. Tento jev,

při kterém dochází k preferenci na základě exprese receptorů k určitému typu signalizace a přenášení odpovědi, může vysvětlovat samotný princip regulace MSCs neurotransmitery [48]. Upřednostnění určitého typu vedení signálů může mít vliv na samotnou diferenciaci a funkci.

D1R a D2R receptory opět nalezneme na většině buněk, včetně buněk imunitního systému (B-lymfocyty, T-lymfocyty, NK buňky, neutrofilly) a MSCs. Dopaminové receptory se vyskytují na membráně a v cytoplazmě. U mezenchymálních buněk kostní dřeně se vyskytuje větší počet D1R receptorů než D2R receptorů [49].

Taktéž glukokortikoidové receptory se vyskytují téměř ve všech buňkách, u MSCs jsou důležité při proliferaci a diferenciaci [50]. Účinek glukokortikoidů nastupuje pomaleji, ale odpověď je déle trvajících.

## 6.3 Katecholaminy

### 6.3.1 Adrenalin, noradrenalin

Při výzkumu účinku noradrenalinu na MSCs bylo zjištěno, že po stimulaci buněk noradrenalinem dochází ke zvýšené citlivosti MSCs na katecholaminy. Jedná se o dočasný jev, při kterém buňky reagují na nižší dávky hormonů po dobu cca 6 hodin po aplikaci. Po stimulaci MSCs izolovaných z tukové tkáně noradrenalinem *in vitro* došlo ke zvýšené expresi  $\alpha_{1A}$ -adrenergních receptorů na povrchu buněk. Zvýšená exprese  $\alpha_{1A}$  receptorů je řízena stimulací  $\beta$ -adrenergních receptorů a aktivítě AC, jak bylo potvrzeno pokusy s alprenololem,  $\beta$ -antagonistou. Vedení signálů aktivací  $\alpha_{1A}$  receptorů probíhá  $Ca^{2+}$  dependentní dráhou, kdy při tvorbě a vedení signálu platí pravidlo „vše nebo nic“. Na základě zvýšené senzitivity a exprese  $\alpha_{1A}$  receptorů dochází k výměně signálních drah a preference z  $\beta$ -adrenergní na  $\alpha_{1A}$ - adrenergní [51]. Důvod záměny není doposud známý, jedna z teorií mluví o zvýšení parakrinní sekrece a exocytózy takto aktivovaných buněk. Zajímavostí může být pak skutečnost, že  $\alpha_{1A}$ - adrenergní dráha je jednou z hlavních drah embryonální adrenergní signalizace (tzv. heterologní senzitivity).

Další studie se zabývá společnou interakcí  $\beta_2$ -adrenergních receptorů a TLR2 receptorů u mezenchymálních kmenových buněk z kostní dřeně (human bone marrow



mesenchymal stem cells – HBM-MSCs) a keratinocytů při hojení ran. Příčiny chronických ran jsou neznámé, jedním z důvodů narušeného hojení je bakteriální kolonizace a prodloužená zánětlivá fáze. TLR2 je membránový receptor ze skupiny Toll-like receptorů vyskytující se na různých buňkách imunitního systému a také MSCs. Má zásadní roli při detekování patogenních antigenů. Po aplikaci adrenalinu a následné stimulaci  $\beta_2$ -adrenergických receptorů u HBM-MSCs *in vitro* došlo ke zvýšené expresi TLR2 na HBM-MSCs, zvýšené produkci IL-6, zhoršení průběhu hojení ran, zpomalení uzavírání rány a snížené migraci buněk do místa poranění *in vivo*. Aplikován byl adrenalin po dobu 4 hodin v koncentraci 50 nM, která zhruba odpovídá koncentraci u lidí během stresové odpovědi.

Pokud po stimulaci adrenalinem dojde k navýšení počtu TLR2, buňky a tkáň jsou citlivější na různé patogeny a rychleji se u nich spouští zánětlivá odpověď. Odpovídá tomu i zvýšená produkce cytokinu IL-6, který má zánětlivé účinky. Výsledky naznačují, že působením adrenalinu dochází k zánětlivé odpovědi, prodloužení zánětlivé fáze hojení rány a tím zpomalení celého procesu hojení. Po aplikaci  $\beta_2$  – antagonisty timololu, byl pozorovaný účinek opačný. Dochází ke zvýšené migraci HBM-MSCs a snížení produkce IL-6 [52]. I proto se  $\beta$ -blokátory využívají při léčbě pacientů s popálením kůže [53].

Mezi další sledované efekty působení noradrenalinu a adrenalinu na MSCs patří ovlivnění metabolismu kostí. Vlivem adrenalinu došlo ke snížení osteogeneze u HBM-MSCs. Fáze diferenciaci HBM-MSCs jsou: pre-osteoblasty, osteoblasty a osteocyty. U buněk kultivovaných s adrenalinem byla detekována snížená acetylace promotoru miRNA-21, která podporuje osteodiferenciaci u HBM-MSCs; také došlo ke snížené expresi genů první a pozdní fáze osteogeneze, RUNX2, OSX a OCN, OPN. Bližší podrobnosti tohoto jevu zatím nejsou objasněny. Mimo jiné, adrenergní signály stimulovaly expresi osteoklastických diferenciacních faktorů u osteoblastů a tím došlo k podpoření odbourávání kostní tkáň. Výsledky studie potvrzují negativní vliv adrenalinu na osteogenezi a poukazují na spojitost psychického stresu a psychologicky-indukovaných onemocnění kostí [54].

I další práce se zabývají tématem osteogeneze, MSCs a jejím ovlivněním nervovým systémem. Jedním z takových témat je regenerace kostní tkáň při operacích a různých chirurgických zákrocích, např. při distrakční osteogenezi. Denervací nervových vláken v okolí tkáň se snížila koncentrace noradrenalinu v místě zákroku; tímto zásahem vzrostla migrace MSCs z periferních tkáň, diferenciaci do osteoblastů a regenerace. Noradrenalin

podle výsledků *in vitro* a *in vivo* působením na  $\beta_3$ -adrenergní receptory MSCs snížil migraci a mobilizaci MSCs z perivaskulárních nik, a také expresi genů nutných pro osteogenezi [55]. Rovněž docházelo ke změnám sekrece SDF-1 faktoru, který funguje jako ligand pro CXCR4 chemokinový receptor na MSCs [56].

Noradrenalin ve vysoké koncentraci působí negativně rovněž na chondrogenezi. Chondrogeneze řízená MSCs tvoří biologickou platformu pro regeneraci chrupavek. Kapacita regenerace chrupavčitých tkání je limitována. Závisí na kombinaci růstových faktorů, hormonů, aktivitě MSCs a progenitorových buněk chondrocytů (cartilage progenitor cell – CPC). Studium regulace chondrogeneze nervovým systémem prokázala zvýšení noradrenalinu v synoviální tekutině vlivem systematického stresu po operaci kloubu. Pokud koncentrace dosáhla  $10^{-6}$  M, stimulací  $\beta_2$ -adrenergních receptorů byla potlačena chondrogeneze. Působením noradrenalinu došlo u MSCs a CPC ke snížené syntéze kolagenu typu II, glykosaminoglykanů a snížené expresi chondrogenického transkripčního faktoru SOX9. U MSCs byly zároveň potvrzené markery hypertrofie a sice kolagenu typu X a matrix metaloproteinázy 13 [57].

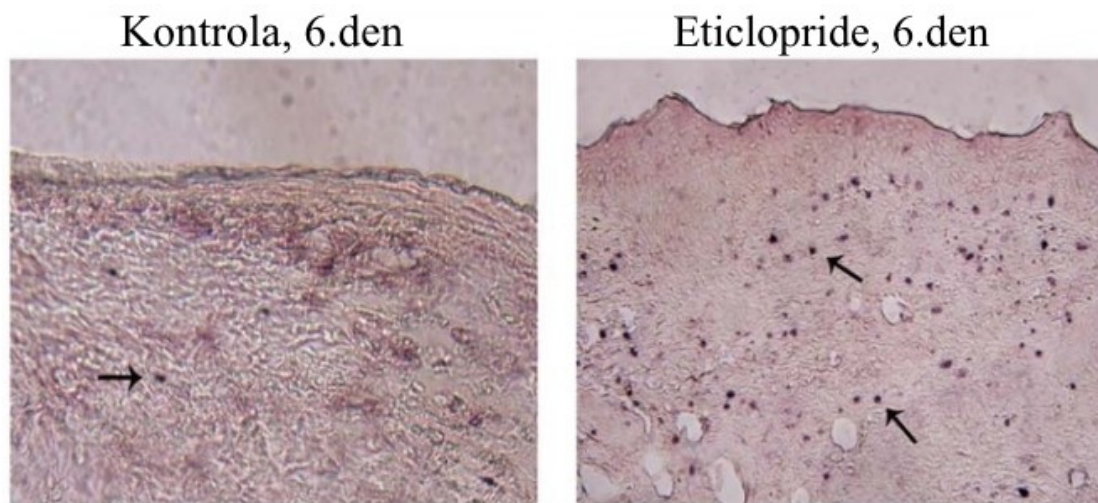
### 6.3.2 Dopamin

Poranění je druh stresu, při kterém regulační mechanismy, hormony a neurotransmitery nastartují opravné a obnovující mechanismy. Na příkladu kožního zranění lze dobře popsat funkce a vliv dopaminu na hojení rány.

Dopamin se do buněk kůže dostává díky bohatým nervovým zakončením, případně lokální syntézou keratinocyty, váže se na D1R a D2R receptory a ovlivňuje vývoj hojení. Po navázání dopaminu na D1R receptory se zvyšuje angiogeneze a hojení je podpořeno, naopak po stimulaci D2R receptorů dochází ke snížení a zhoršení hojení. MSCs jsou důležitou komponentou tohoto procesu. Působením chemokinů a cytokinů tvořených poraněnou tkání a imunitním systémem jsou MSCs přitahovány do místa zranění, kde se podílejí na opravě poškozené tkáně a podpory angiogeneze

Ve studii zabývající se vlivem dopaminu na mobilizaci a migraci MSCs do místa poranění byl použit v *in vitro* a *in vivo* modelu 1  $\mu$ M dopamin, tedy taková koncentrace, která se vyskytuje v nervových synapsích. Po intravenózním aplikování dopaminu došlo k inhibici migrace MSCs do místa rány. Dopamin inhiboval migraci MSCs navázáním na D2-like receptor, ostatní dopaminové receptory vliv na mobilizaci MSCs neměly. Po použití

antagonisty tohoto receptoru, eticlopridu, byl efekt opačný, tedy nastalo zvýšení počtu MSCs v periferní krvi a zvýšení angiogeneze v okolí rány (viz Obr.3). Po navázání dopaminu na D2-like receptor dochází k defosforylaci VEGFR-2 a následné defosforylaci Akt kinázy, což vede ke snížené migraci MSCs. Dalším mechanismem regulace je řízení dynamiky polymerace aktinu v MSCs; defosforylace Akt kinázy vede k depolymeraci aktinu. Fyziologická dávka dopaminu by tedy mohla mít negativní dopad na migraci MSCs do místa poranění a na samotný proces hojení. Nabízí se i možné teoretické využití D2R antagonistů pro urychlení léčby ran [58].



Obrázek 3: Efekt antagonisty D2-like receptoru, eticlopridu, na mobilizaci a migraci MSCs do místa rány. MSCs byly označeny BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) a intravenózně podány kontrolní skupině a skupině myši ošetřených eticlopridem. Šestý den byla tkáň okolo rány imunohistochemicky analyzována za použití značení BrdU. Ve skupině ošetřené eticlopridem byl sledován význačně vyšší počet MSCs značených BrdU v okolí rány než v kontrolní skupině. Výsledky ukazují, že ošetření eticlopridem má pozitivní vliv na mobilizaci a migraci exogenně transplantovaných MSCs do místa rány. Původní zvětšení, x200 [58].

V neposlední řadě je také na místě se zamyslet, zda existuje spojitost častějšího výskytu chronických ran u pacientů, kteří užívají dopaminové antagonisty jako antipsychotika. Antagonisté D1R receptorů mají podobný účinek jako dopamin navázaný na D2-like receptory – snižují angiogenezi a hojení.

Nezbytnou otázkou je také to, kdy se dopamin naváže na D1R či D2R receptory. Samotný výběr receptoru ovlivňuje průběh hojení. V článku autoři mluví pouze o regulaci a vazbě na D2-like receptor (typ D2R), ale MSCs disponují oběma typy receptorů. Dosud není popsáno, jaké další faktory, koncentrace látek či signály, mají vliv na rozhodnutí, kterým směrem se bude vývoj hojení rány dále odehrávat. Taktéž je nutné zmínit rozporuplné výsledky jiných studií, které poukazují na zvýšenou mobilizaci MSCs (respektive

mezenchymálních progenitorů) po stimulaci D2R receptorů (mezi které patří i výše zmíněný D2-like receptor) [30].

## 6.4 Glukokortikoidy

Studie zabývající se vlivem glukokortikoidů na MSCs jsou zaměřené především na syntetické glukokortikoidy (dexametazon, prednison, betametazone aj.). Syntetické glukokortikoidy jsou velice často využívanými medikamenty především v imunosupresivní terapii. Tyto látky s sebou nesou velké množství nežádoucích účinků, např. oslabení imunitního systému, vznik osteoporózy, riziko vzniku Cushingova syndromu, zvýšení krevního tlaku, zvýšení hodnoty krevního cukru. Pochopení molekulárních mechanismů těchto nežádoucích účinků je oblastí zájmu pro případné vylepšení dávkování a užívání kortikoidů při léčbě nejruznějších onemocnění. Z následujících studií lze pouze předpokládat, že přirozené glukokortikoidy by mohly při zvýšené hladině způsobovat stejné či podobné nežádoucí účinky jako syntetické glukokortikoidy.

Ve studii vlivu hydrokortizonu na HBM-MSCs *in vitro* byly sledovány změny exprese genů pro morfogenezi (BMP-4), imunomodulační geny (GALS1, PTGES), geny pro osteogenezi (SPP1, BGLAP) a adipogenezi (FAB4, PPAR- $\gamma$ ); dále schopnost tvorby kolonií a intenzita proliferace. Výsledky byly rozporuplné. Ačkoliv došlo ke zvýšené tvorbě kolonií, proliferace MSCs se snížila. V prvních týdnech hydrokortizon neměl zásadní vliv na změny exprese genů, v pozdějších fázích pokusu však došlo ke snížení markerů osteogeneze (SPP1, BGLAP) a zvýšení exprese časných genů adipogeneze (FAB4). Hydrokortizon neměl vliv na geny pro morfogenezi a imunomodulační geny. Pokusy byly prováděny na kostní dřeni od 7 dárců, rozdíly ve vlastnostech a aktivitě HBM-MSCs se lišily taktéž v závislosti na pohlaví [59].

Glukokortikoidy se podílejí na metabolismu a remodelaci kostí. Dexametazon je důležitou součástí médií pro diferenciaci do osteoblastů. Ve vyšších dávkách ovšem navozuje osteoporózu indukovanou glukokortikoidy. Dochází ke snížené diferenciaci HBM-MSCs do osteoblastů a k nerovnováze mezi osteoblasty a osteoklasty [60]. Další výzkum, který potvrzuje negativní vliv glukokortikoidů na HBM-MSCs, sledoval diferenciační a proliferační vlastnosti HBM-MSCs po zablokování glukokortikoidových receptorů. Výzkumný tým použil antagonistu glukokortikoidového receptoru, RU486, a siRNA blokující expresi receptoru.

Zároveň sledoval senescenci u HBM-MSCs a jejich antioxidační vlastnosti. HBM-MSCs byly kultivovány *in vitro* s RU486 (případně siRNA) ve fetálním bovinním séru. Tým se zabýval pouze přirozenou koncentrací glukokortikoidů v séru, bovinní plazma dle jejich měření obsahovala 2,4 µg/100ml kortikosteronu. HBM-MSCs kultivované v přítomnosti RU486 a siRNA jeden týden vykazovaly zvýšenou proliferaci, zvýšení osteogeneze (OCN), větší aktivitu telomerázy a superoxid dismutázy oproti kontrole. Došlo ke snížení diferenciaci HBM-MSCs do adipocytů a k celkovému zlepšení anti-oxidačních a antisenescenčních mechanismů. HBM-MSCs s takto zablokovanými glukokortikoidovými receptory měly zvýšenou proliferaci ve srovnání s kontrolou i po další tři týdny [61].

Glukokortikoidy jsou využívány v terapiích právě díky svým imunosupresivním účinkům, bohužel tím potlačují i zánětlivou fázi hojení rány. Byly popsány změny po aplikaci dexametazonu *in vivo* u MSCs izolovaných z tukové tkáně. Dexametazon inhiboval kaskádu kyseliny arachidonové, syntézu PGE2 a následně SDF-1, které způsobila snížení migrace MSCs do místa rány a celkově zpomalila průběh léčby [62].

Brian J. Feldman se zabýval MSCs a glukokortikoidy ve spojitosti s metabolickou poruchou a Cushingovým syndromem. Tkáně, které jsou ovlivněny glukokortikoidy u Cushingova syndromu, jsou tuk, svaly a kosti; tedy tkáně odvozené od mezodermu. Hypotéza, kterou Feldman pronesl, poukazovala na možnost řízení a směřování diferenciaci MSCs vlivem zvýšené hladiny glukokortikoidů. Glukokortikoidy by teoreticky mohly fungovat jako “přepínače” mezi tvorbou buněk svalů, tuku a kostí. Pro potvrzení této teorie byly detekovány molekulární cíle glukokortikoidů, které mají vliv na směřování diferenciaci MSCs. Zvýšená hladina glukokortikoidů ovlivnila expresi genu pro myostatin. Myostatin je protein kontrolující správný růst a vývoj svalových tkání v těle. Vlivem zvýšené hladiny glukokortikoidů na MSCs byla navozena diferenciaci do adipocytů. Samotný myostatin u MSCs také indukoval diferenciaci do adipocytů. Bližší vysvětlení molekulárních mechanismů tohoto jevu by usnadnilo tvorbu cílených terapií při Cushingově syndromu a metabolických poruchách [63].

## 6.4 Další hormony

ACTH je peptidický hormon HPA osy, který vzniká z proopiomelanokortinu. Studie sledovala u myších D1 buněk (linie MSCs izolovaných z kostní dřeně) účinek ACTH během adipogeneze. U D1 buněk byla navozena diferenciaci do adipocytů, poté k nim byl přidáván

ACTH. V závislosti na dávce došlo k podpoře adipogeneze a ke zvýšené akumulaci lipidů. Data ukazují, že se zvýšenou hladinou stresu se zvyšuje hladina ACTH a glukokortikoidů, které se mohou podílet na zvýšené adipogenezi a ukládání tuků jako energetické zásoby během stresu [64].

Oxytocin, hormon laktace a stahů hladké svaloviny, se také podílí na neuroendokrinní regulaci stresové odpovědi. Studie zabývající se oxytocinem sledují především jeho úbytek a negativní projevy s ním související u žen v menopauze.

Dle výsledků výzkumu oxytocin kontroluje diferenciaci MSCs a působí proti osteoporóze. Při osteoporóze dochází k nerovnováze mezi resorbcí a remodelací kostí, a k nahrazování osteoblastů v kostní tkáni adipocyty a tím k měknutí a křehnutí kostí. Po aplikaci oxytocinu na MSCs izolovaných z tukové tkáně *in vitro* došlo ke snížení adipogeneze a naopak zvýšení osteogeneze. U samic myši a krys, kterým byla navozena osteoporóza ovarioctomií a následně jim byl podán oxytocin, došlo ke zvrácení průběhu osteoporózy a ztrátě kostí. Pokles hladiny oxytocinu u samic myši a krys po ovarioctomii činil 55% a shodoval se s výsledky poklesu u žen v menopauze [65].

Působení oxytocinu na MSCs je sledováno také ve spojitosti vývoje terapií při léčbě ischemie srdce. Aplikace MSCs izolovaných z pupečnickové krve pre-kultivovaných s oxytocinem *in vitro* vedla ke zvýšení jejich migrace do poškozené srdeční tkáně a diferenciaci do kardiomyocytů. Ačkoliv *in vitro* výsledky byly příznivé, aplikace *in vivo* ošetřených MSCs nebyla tak účinná, jak se předpokládalo [66].

## 6.5 Navozený chronický stres

Předchozí studie sledovaly účinek a vliv samotných hormonů a neurotransmiterů na MSCs. Existují i výzkumy, které se přímo zabývají vyvoláním stresu, jeho působením na MSCs, regeneraci a hojení ran, či na změny v imunitním systému. Je známo, že stres zpožďuje proces hojení [67].

Ve studii byl sledován vliv chronického stresu a snížení reparačního potenciálu terapeuticky podávaných MSCs. V myším *in vivo* modelu bylo navozeno poškození jater tetrachlormethanem, následně byly injikovány exogenní MSCs. Poté, co byly MSCs detekovány v místě poškození (4.den), byly myši podrobeny stresu omezením prostoru v určitých intervalech po dobu 2 týdnů. U kontrol, kde byly podány jen exogenní MSCs v rámci terapie a podpory regenerace, došlo ke zrychlení hojení a MSCs diferenciovaly do myofibroblastů. U myši, které byly vystaveny stresu, uvolněný kortikosteron potlačil

tvorbu TGF- $\beta$ 1 MSCs, který je důležitým faktorem pro diferenciaci do myofibroblastů. Regenerace tkáně byla zpomalena. Výsledky podpořily data z *in vitro* pokusů [68].

Další studie se zabývala změnami v rychlosti hojení poraněných plic u stresovaných krys. Po navození poranění plic byly krysy podrobeny stresu omezením prostoru po dobu šesti dní. U jedné skupiny byla před stresovými podmínkami aplikována v rámci terapie injekce exogenních MSCs. U této skupiny došlo k urychlení hojení. Nejpomaleji docházelo k hojení poškozené plicní tkáně u skupiny pouze stresované. Kontrolní skupina, u které nebylo nijak zasahováno do průběhu léčby, vykazovala pomalejší hojení než skupina s aplikovanými MSCs, zároveň ale měla rychlejší hojení, než skupina vystavená stresu. Výsledek lze brát jako další potvrzení negativního vlivu stresu na hojení. K zamyšlení pak zůstává fakt, že exogenní MSCs, ačkoliv se vyskytovaly v těle organismu, které bylo stresované, stejně urychlily průběh hojení v porovnání s kontrolou [69].

Je možné, že nejen stres, ale také deprese má negativní vliv na hojení. Vlivem neočekávaných stresových situací po dobu 4 týdnů byla u krys navozena deprese, která byla potvrzena testy chování. U takových krys bylo pozorováno zpomalení hojení kostí a snížená diferenciaci BM-MSCs do osteoblastů [70].

Ne všechny studie, kde měl stres vliv na MSCs, popisují pouze negativní působení. V *in vivo* modelu byla sledována podpora lymfocytů a snížená redukce splenocytů MSCs během stresu. Tato studie se však lišila v délce trvání vyvolaného chronického stresu. V této studii byl stres navozen po dobu 2 dnů v intervalech po 12 hodinách; předchozí studie vystavily zvířecí modely stresu po delší dobu, mnohdy v řádech týdnů [71].

## 7. Závěr

MSCs představují v dnešní době naději pro léčbu závažných onemocnění. Přibývají další a další klinické studie, které se snaží využít výhod MSCs, a sice možnost autologní transplantace, imunomodulační, protizánětlivé schopnosti a schopnost diferenciaci do několika buněčných typů. MSCs se přirozeně vyskytují v kostní dřeni a téměř ve všech tkáních organismu, kde se podílejí na jejich regeneraci.

Při vývoji terapie je nutné brát ohled na působení vnitřního prostředí organismu na MSCs. Dlouhodobý stres působí téměř na všechny tkáně v těle a zásadně mění prostředí organismu vlivem uvolněných hormonů a neurotransmiterů. Taktéž je opomíjen možný vedlejší účinek léků, např. beta blokátorů či antipsychotik, které ovlivňují v těle mnoho dějů; jejich vliv na hojení a regeneraci organismu není stále zcela objasněn.

Vliv stresových hormonů na MSCs je různorodý, závisí na jejich koncentraci a dalších faktorech. Ke změnám dochází např. na úrovni ovlivnění diferenciaci. Ve studiích byla sledována snížená osteogeneze a chondrogeneze; zároveň byla pozorována preference diferenciaci MSCs do adipocytů. Důvodem by mohlo být tvoření tukové energetické zásoby pro stresovou odpověď.

Zajímavým jevem je dočasně zesílená citlivost MSCs ke katecholaminům po stimulaci adrenalinem a upřednostnění určitých signálních drah. Nabízí se hypotéza, že vlivem zvýšené citlivosti k ostatním katecholaminům je zajištěna rychlejší odpověď, a tedy rychlejší změny vlastností a funkcí MSCs.

V rámci studií hojení ran dochází působením stresu na MSCs ke snížené migraci MSCs do místa poranění a snížení produkce chemotaktických molekul. Studie, která se zabývala interakcí  $\beta_2$ -adrenergických receptorů a TLR2 na MSCs poskytla data, které naznačují, že působením krátkodobého stresu dochází ke zvýšené prozánětlivé odpovědi. Výsledky vyvracejí předpoklad, že krátkodobý stres indukuje efektivnější imunitní odpověď a má na organismus pozitivní vliv. Při prodloužení zánětlivé dochází k prodloužení doby léčby a zhoršenému uzavírání rány.

Některé zmíněné studie přináší rozporuplné výsledky. Tato problematika je tak komplexní, že nelze prohlásit zcela jasný závěr a stanovisko. Na regeneraci, hojení a diferenciaci se podílí celá řada látek a buněk, které mezi sebou kooperují. Příklady uvedené v této práci pouze vyzdvihují možnosti, které mohou během stresu nastat. Bližší studie těchto jevů by mohla významně přispět k objasnění regenerace poškozené tkáně MSCs a přizpůsobení MSCs konstruktů používaných v regenerativní medicíně.



## 8. Seznam literatury

- [1] Y. Jiang *et al.*, “Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow,” *Nature*, vol. 418, no. 6893, pp. 41–49, Jul. 2002.
- [2]\* P. Hernigou, “Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka,” *Int. Orthop.*, vol. 39, no. 4, pp. 807–817, 2015.
- [3] M. Dominici *et al.*, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement,” *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006.
- [4] N. Guimarães-Camboa *et al.*, “Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo,” *Cell Stem Cell*, vol. 20, no. 3, p. 345–359.e5, Mar. 2017.
- [5] E. Alt *et al.*, “Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential,” *Biol. Cell*, vol. 103, no. 8, pp. 403–403, 2011.
- [6]\* L. A. Marquez-Curtis, A. Janowska-Wieczorek, L. E. McGann, and J. A. W. Elliott, “Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects,” *Cryobiology*, vol. 71, no. 2. Academic Press, pp. 181–197, 01-Oct-2015.
- [7]\* J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic, A. Khademhosseini, and A. Mobasheri, “Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche,” *Methods*, vol. 99, pp. 62–68, 2015.
- [8] M. F. Pittenger *et al.*, “Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells,” *Science (80-. )*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, Apr. 1999.
- [9]\* E. Spaeth, A. Klopp, J. Dembinski, M. Andreeff, and F. Marini, “Inflammation and tumor microenvironments: Defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells,” *Gene Therapy*, vol. 15, no. 10. pp. 730–738, 10-May-2008.
- [10]\* A. I. Caplan, “Mesenchymal stem cells: Time to change the name!,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 6, pp. 1445–1451, Jun. 2017.
- [11]\* F. Dazzi, R. Ramasamy, S. Glennie, S. P. Jones, and I. Roberts, “The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis,” *Blood Rev.*, vol. 20, no. 3, pp. 161–171, 2006.
- [12] L. da Silva Meirelles, “Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 11, pp. 2204–2213, 2006.
- [13]\* M. E. Bernardo and W. E. Fibbe, “Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation,” *Cell Stem Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 392–402, 2013.
- [14]\* M. Franquesa, M. J. Hoogduijn, O. Bestard, and J. M. Grinyó, “Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on B Cells,” *Front. Immunol.*, vol. 3, p. 212, 2012.
- [15]\* D. Kyurkchiev, “Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells,” *World J. Stem Cells*, vol. 6, no. 5, pp. 552–570, Nov. 2014.
- [16] E. V. Badiavas and V. Falanga, “Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells,” *Arch. Dermatol.*, vol. 139, no. 4, pp. 510–516, Apr. 2003.
- [17]\* R. A. Poltavtseva, A. V. Poltavtsev, G. V. Lutsenko, and E. V. Svirshchevskaya, “Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy,” *Cell and Tissue Research*, vol. 375, no. 3. Springer Berlin Heidelberg, pp. 563–574, 20-Nov-2018.

- [18]\* S. A. Bergfeld and Y. A. DeClerck, “Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 29, no. 2, pp. 249–261, 2010.
- [19] W. Zhu *et al.*, “Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 80, no. 3, pp. 267–274, 2006.
- [20]\* F. Marofi, G. Vahedi, A. Biglari, A. Esmaeilzadeh, and S. S. Athari, “Mesenchymal stromal/stem cells: A new era in the cell-based targeted gene therapy of cancer,” *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. DEC. 18-Dec-2017.
- [21] R. Ciccocioppo *et al.*, “Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn’s disease,” *Gut*, vol. 60, no. 6, pp. 788–798, 2011.
- [22] M. A. González, E. González-Rey, L. Rico, D. Büscher, and M. Delgado, “Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells,” *Arthritis Rheum.*, vol. 60, no. 4, pp. 1006–1019, 2009.
- [23] F. Laso-García *et al.*, “Therapeutic potential of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stem cells in a model of progressive multiple sclerosis,” *PLoS One*, vol. 13, no. 9, Sep. 2018.
- [24] J. Barbado, S. Tabera, A. Sánchez, and J. García-Sancho, “Therapeutic potential of allogeneic mesenchymal stromal cells transplantation for lupus nephritis,” *Lupus*, vol. 27, no. 13, pp. 2161–2165, Nov. 2018.
- [25]\* A. V Vanikar, H. L. Trivedi, and U. G. Thakkar, “Stem cell therapy emerging as the key player in treating type 1 diabetes mellitus,” *Cytotherapy*, vol. 18, no. 9, pp. 1077–1086, 2016.
- [26]\* B. Amorin *et al.*, “Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review,” *Hum. Cell*, vol. 27, no. 4, pp. 137–150, Oct. 2014.
- [27]\* Y.-H. Wang, D.-B. Wu, B. Chen, E.-Q. Chen, and H. Tang, “Progress in mesenchymal stem cell-based therapy for acute liver failure.,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 9, no. 1, p. 227, 2018.
- [28] C. E. Pullar, A. Rizzo, and R. R. Isseroff, “ $\beta$ -Adrenergic Receptor Antagonists Accelerate Skin Wound Healing,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 30, pp. 21225–21235, 2006.
- [29]\* J. L. Jiang, Y. H. Qiu, Y. P. Peng, and J. J. Wang, “Immunoregulatory role of endogenous catecholamines synthesized by immune cells,” *Acta Physiol. Sin.*, vol. 58, no. 4, pp. 309–317, 2006.
- [30] I. Mirones *et al.*, “Dopamine mobilizes mesenchymal progenitor cells through d2-class receptors and their pi3k/akt pathway,” *Stem Cells*, vol. 32, no. 9, pp. 2529–2538, Sep. 2014.
- [31]\* M. Jaber, S. W. Robinson, C. Missale, and M. G. Caron, “Dopamine receptors and brain function,” *Neuropharmacology*, vol. 35, no. 11, pp. 1503–1519, 1996.
- [32]\* L. S. Gensler, “Glucocorticoids: Complications to Anticipate and Prevent,” *The Neurohospitalist*, vol. 3, no. 2, pp. 92–97, Apr. 2013.
- [33]\* E. R. de Kloet, M. Joëls, and F. Holsboer, “Stress and the brain: from adaptation to disease,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 6, no. 6, pp. 463–475, Jun. 2005.
- [34] D. Jezova, I. Skultetyova, D. I. Tokarev, P. Bakos, and M. Vidas, “Vasopressin and oxytocin in stress,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 771, pp. 192–203, Dec. 1995.
- [35]\* A. E. Dief, E. V. Sivukhina, and G. F. Jirikowski, “Oxytocin and Stress Response,” *Open J. Endocr. Metab. Dis.*, vol. 08, no. 03, pp. 93–104, 2018.
- [36] N. Maninger, J. P. Capitanio, W. A. Mason, J. D. Ruys, and S. P. Mendoza, “Acute and chronic stress increase DHEAS concentrations in rhesus monkeys,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 35, no. 7, pp. 1055–1062, 2010.

- [37]\* E. Fee and T. Brown, "Walter Bradford Cannon: Pioneer Physiologist of Human Emotions," *American Journal of Public Health*, vol. 92, no. 10. American Public Health Association, p. 1594, 2002.
- [38]\* A. Večeřová-Procházková and R. Honzák, "Stres , Eustres a Distres," *Interní Medicína Pro Praxi*, vol. 10, pp. 188–192, 2008.
- [39]\* J. E. Sherin and C. B. Nemeroff, "Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma.," *Dialogues Clin. Neurosci.*, vol. 13, no. 3, pp. 263–278, 2011.
- [40]\* F. Mora, G. Segovia, A. Del Arco, M. De Blas, and P. Garrido, "Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration," *Brain Res.*, vol. 1476, no. January, pp. 71–85, 2012.
- [41]\* F. S. Dhabhar, "Effects of stress on immune function: The good, the bad, and the beautiful," *Immunologic Research*, vol. 58, no. 2–3. pp. 193–210, 2014.
- [42] E. S. Epel *et al.*, "Accelerated telomere shortening in response to life stress," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 49, pp. 17312–17315, 2004.
- [43] C. M. Stoney, M. C. Davis, and K. A. Matthews, "Sex Differences in Physiological Responses to Stress and in Coronary Heart Disease: A Causal Link?," *Psychophysiology*, vol. 24, no. 2, pp. 127–131, 1987.
- [44] E. J. Bennett, C. C. Tennant, C. Piesse, C. A. Badcock, and J. E. Kellow, "Level of chronic life stress predicts clinical outcome in irritable bowel syndrome," *Gut*, vol. 43, no. 2, pp. 256–261, 1998.
- [45] J. K. Kiecolt-Glaser, P. T. Marucha, A. M. Mercado, W. B. Malarkey, and R. Glaser, "Slowing of wound healing by psychological stress," *Lancet*, vol. 346, no. 8984, pp. 1194–1196, 1995.
- [46] S. Méndez-Ferrer *et al.*, "Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche," *Nature*, vol. 466, no. 7308, pp. 829–834, 2010.
- [47] P. A. Tyurin-Kuzmin, D. T. Dyikanov, J. I. Fadeeva, V. Y. Sysoeva, and N. I. Kalinina, "Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells," *Sci. Data*, vol. 5, no. October, p. 180196, 2018.
- [48] P. D. Kotova *et al.*, "Functional expression of adrenoceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 9, pp. 1899–1908, 2014.
- [49] P.-U. Cheong, T. Ma, Y. Zheng, X.-Y. Ge, Y. Zhang, and Y. Lin, "Dopamine receptor expression on primary osteoblasts and bone marrow mesenchymal stem cells of rats," *Int J Clin Exp Med*, vol. 11, no. 3, pp. 1765–1771, 2018.
- [50] I. Cárcamo-Orive *et al.*, "Regulation of human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation capacity by glucocorticoid receptor and AP-1 crosstalk," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 25, no. 10, pp. 2115–2125, 2010.
- [51] P. A. Tyurin-Kuzmin *et al.*, "Activation of  $\beta$ -adrenergic receptors is required for elevated  $\alpha$ 1A-adrenoceptors expression and signaling in mesenchymal stromal cells," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. April, pp. 1–9, 2016.
- [52] M. R. Dasu *et al.*, "Crosstalk Between Adrenergic and Toll-Like Receptors in Human Mesenchymal Stem Cells and Keratinocytes: A Recipe for Impaired Wound Healing," *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 3, no. 6, pp. 745–759, 2014.
- [53] S. Arbabi *et al.*, "Beta-Blocker Use Is Associated with Improved Outcomes in Adult Burn Patients," *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care*, vol. 56, no. 2, pp. 265–271, Feb. 2004.
- [54] D. Chen and Z. Wang, "Adrenaline inhibits osteogenesis via repressing miR-21 expression," *Cell Biol. Int.*, vol. 41, no. 1, pp. 8–15, Jan. 2017.

- [55] Z. Du *et al.*, “Sympathetic denervation-induced MSC mobilization in distraction osteogenesis associates with inhibition of MSC migration and osteogenesis by norepinephrine/adrb3,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. 105976, 2014.
- [56] B. Wu *et al.*, “Norepinephrine inhibits mesenchymal stem cell chemotaxis migration by increasing stromal cell-derived factor-1 secretion by vascular endothelial cells via NE/abrd3/JNK pathway,” *Exp. Cell Res.*, vol. 349, no. 2, pp. 214–220, 2016.
- [57] Z. Jenei-Lanzl *et al.*, “Norepinephrine inhibition of mesenchymal stem cell and chondrogenic progenitor cell chondrogenesis and acceleration of chondrogenic hypertrophy,” *Arthritis Rheumatol.*, vol. 66, no. 9, pp. 2472–2481, 2014.
- [58] S. Shome, P. S. Dasgupta, and S. Basu, “Dopamine regulates mobilization of mesenchymal stem cells during wound angiogenesis,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, 2012.
- [59] N. N. Shipunova, N. A. Petinati, and N. I. Drize, “Effect of hydrocortisone on multipotent human mesenchymal stromal cells,” *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 155, no. 1, pp. 159–163, 2013.
- [60] D. A. Zhou, H. X. Zheng, C. W. Wang, D. Shi, and J. J. Li, “Influence of glucocorticoids on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells,” *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 15, no. 1, 2014.
- [61] N. Wei *et al.*, “Glucocorticoid receptor antagonist and siRNA prevent senescence of human bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro,” *Cell Tissue Res.*, vol. 354, no. 2, pp. 461–470, Nov. 2013.
- [62] T. Kato *et al.*, “SDF-1 improves wound healing ability of glucocorticoid-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 493, no. 2, pp. 1010–1017, Nov. 2017.
- [63] B. J. Feldman, “Glucocorticoids influence on mesenchymal stem cells and implications for metabolic disease,” *Pediatr. Res.*, vol. 65, no. 2, pp. 249–251, Feb. 2009.
- [64] T. J. Rhodes, M. Paziienza, and J. F. Evans, “ACTH Enhances Lipid Accumulation in Bone-marrow derived Mesenchymal stem cells undergoing adipogenesis,” *J. Student Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 69–73, 2015.
- [65] C. Elabd *et al.*, “Oxytocin Controls Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Reverses Osteoporosis,” *Stem Cells*, vol. 26, no. 9, pp. 2399–2407, 2008.
- [66] Y. S. Kim *et al.*, “Priming of mesenchymal stem cells with oxytocin enhances the cardiac repair in ischemia/reperfusion injury,” *Cells Tissues Organs*, vol. 195, no. 5, pp. 428–442, 2012.
- [67] N. Eijkelkamp, C. G. Engeland, P. K. Gajendrareddy, and P. T. Marucha, “Restraint stress impairs early wound healing in mice via  $\alpha$ -adrenergic but not  $\beta$ -adrenergic receptors,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 21, no. 4, pp. 409–412, 2007.
- [68] X. Yang *et al.*, “Chronic restraint stress decreases the repair potential from mesenchymal stem cells on liver injury by inhibiting TGF- $\beta$ 1 generation,” *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 6, pp. 1–10, 2014.
- [69] A. V. Gore, L. E. Bible, D. H. Livingston, A. M. Mohr, and Z. C. Sifri, “Can mesenchymal stem cells reverse chronic stress-induced impairment of lung healing following traumatic injury?,” *J. Trauma Acute Care Surg.*, vol. 78, no. 4, pp. 767–772, 2015.
- [70] C. Nie, Z. Wang, and X. Liu, “The effect of depression on fracture healing and osteoblast differentiation in rats,” *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, vol. 14, pp. 1705–1713, Jun. 2018.
- [71] G. Cao *et al.*, “Mesenchymal stem cells prevent restraint stress-induced lymphocyte depletion via interleukin-4,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 38, pp. 125–132, 2014.

Poznámka: Sekundární zdroje jsou označeny \*.