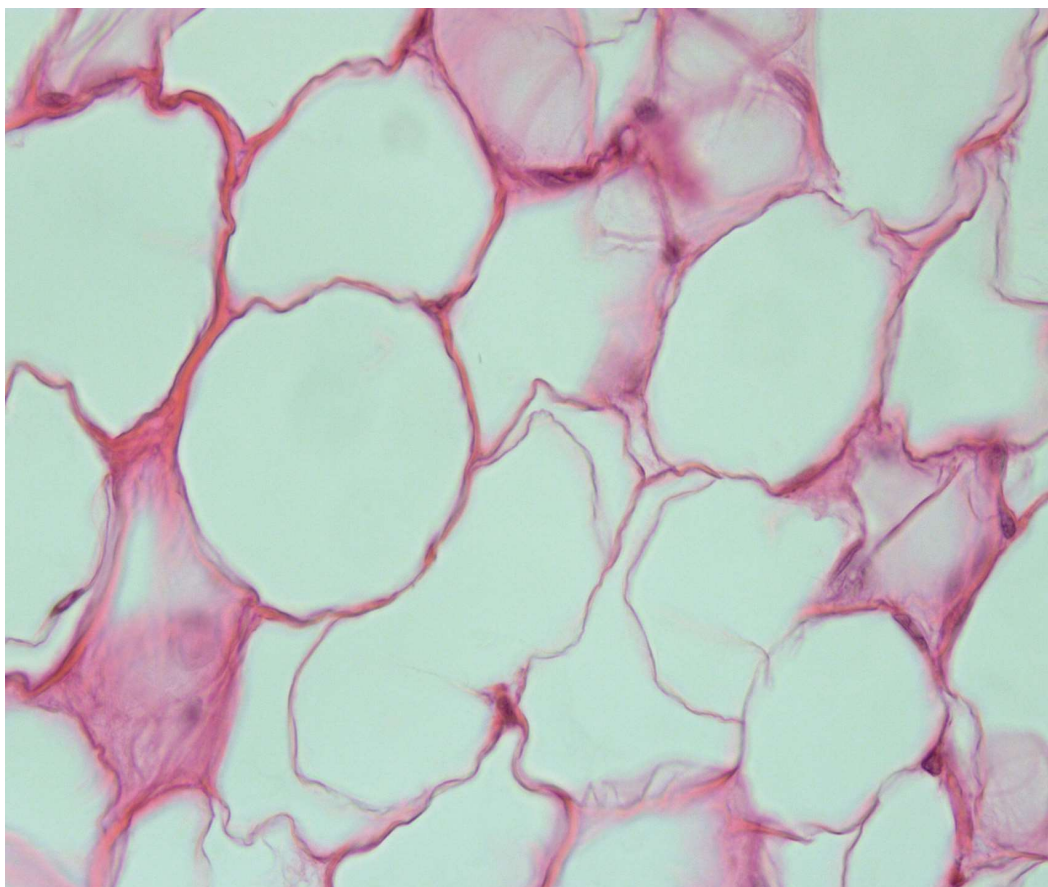


doc. MUDr. Radoslav Zamborský, PhD.

BIOMEDICÍNSKY VÝSKUM IV.

ZBORNÍK VEDECKÝCH PRÁC



Bratislava 2022

Biomedicínsky výskum IV.

Editor: doc. MUDr. Radoslav Zamborský, PhD.

Vydal: © CEBM Slovakia spol. s r. o., Bratislava, 2022

Recenzenti: RNDr. Marcela Kuniaková, PhD.
RNDr. Zuzana Varchulová Nováková, PhD.

Publikácia neprešla jazykovou korektúrou a za odbornú stránku zodpovedajú autori.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovat', ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľa autorských práv.

ISBN: 978 – 80 – 973119 – 1 – 9

EAN: 9788097311919

OBSAH

Významné neuropeptidy v kontexte úzkostnej a depresívnej poruchy	3
Terapeutický potenciál bioaktívnych molekúl secernovaných kmeňovými bunkami zubnej drene	11
Zdravotný aspekt rómskej populácie na Slovensku	17
Somatické kmeňové bunky získané z tukového väziva ako zdroj bioaktívnych molekúl a ich využitie v terapii vybraných patologických stavov	21
Tkanivové inžinierstvo – základné princípy a perspektíva pre modernú medicínu	28
Umelá inteligencia a jej využitie pri spracovávaní vedeckej literatúry o COVID-19	36
Interakcie polymérnych skafoldov s hostiteľským imunitným systémom	41
Translačný výskum v onkológii - Skúsenosti Jednotky translačného výskumu LF UK a NOÚ	48

Významné neuropeptidy v kontexte úzkostnej a depresívnej poruchy

Ida KUPCOVÁ¹, Martin KLEIN², Štefan HARSÁNYI¹

¹Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava; ²Ústav histológie a embryológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

Súhrn

Celosvetovo dochádza k rastúcemu trendu depresie a úzkosti. Tento trend výrazne ovplyvňuje duševné zdravie obyvateľstva, a tak významne prispieva k chorobnosti a v najhoršom prípade k zvyšujúcemu sa počtu suicidálnych pokusov. Depresívna porucha je jednou z popredných duševných chorôb na celom svete a znižuje kvalitu života mnohých ľudí. Podľa WHO, asi 5% celosvetovej populácie trpí depresiou. Novšie štúdie uvádzajú ohromujúcu globálnu prevalenciu 27,6%. Moderná medicína zásobená zástupom antidepresív, anxiolytík a hypnotík stále nedokáže dosiahnuť remisiu u mnohých pacientov. Patofyziológia depresie je stále len okrajovo pochopená, čo vedie tímy vedcov z rôznych krajín sveta, aby sa zameriavali na stále novšie metódy diagnostiky, či liečby a tým prispievali k širšiemu obrazu tejto poruchy. Je nevyhnutné nájsť spôsob a možnosť kvantitatívneho vyhodnotenia závažnosti choroby alebo efektivity liečby pomocou určitých špecifických markerov (biomarkerov) alebo panelu biomarkerov. Medzi významné diagnostické markery depresívnej poruchy (spolu s úzkosťou a chronickým stresom) patria neuropeptidy, cytokíny, hormóny a markery oxidatívneho stresu. Pokroky v molekulárnej biológii umožnili skúmať tieto malé molekuly s obrovským potenciálom.

Kľúčové slová: depresívna porucha, úzkostná porucha, diagnostika, neuropeptidy, markery

Important neuropeptides in the context of anxiety and depressive disorders

Summary

There is a growing trend of depression and anxiety worldwide. This trend significantly affects the mental health of the population, thus significantly contributing to morbidity and, in the worst case, to the increasing number of suicide attempts. Depressive disorder is one of the leading mental illnesses worldwide and reduces the quality of life of many people. According to the WHO, about 5% of the global population suffers from depression. More recent studies report a staggering global prevalence of 27.6%. Modern medicine, stocked with a host of antidepressants, anxiolytics and hypnotics, still fails to achieve remission in many patients. The pathophysiology of depression is still only marginally understood, which leads teams of scientists from different countries around the world to focus on ever newer methods of diagnosis and treatment and thereby contribute to a broader picture of this disorder. It is essential to find a way and possibility to quantitatively evaluate the severity of the disease or the effectiveness of the treatment using certain specific markers (biomarkers) or a panel of biomarkers. Important diagnostic markers of depressive disorder (along with anxiety and chronic stress) include neuropeptides, cytokines, hormones, and markers of oxidative stress. Advances in molecular biology have made it possible to investigate these small molecules with enormous potential.

Keywords: depressive disorder, anxiety disorder, diagnosis, neuropeptides, markers

Úvod

Celosvetovo dochádza k rastúcemu trendu depresie a úzkosti. Tento trend výrazne ovplyvňuje duševné zdravie obyvateľstva, a tak významne prispieva k chorobnosti a v najhoršom prípade k zvyšujúcemu sa počtu suicidálnych pokusov. Depresívna porucha je jednou z popredných duševných chorôb na celom svete a znižuje kvalitu života mnohých ľudí. Podľa WHO, asi 5% celosvetovej populácie trpí depresiou. Novšie štúdie uvádzajú ohromujúcu globálnu prevalenciu 27,6%. V klinickej praxi sa pri prvom kontakte najčastejšie vyskytuje psychiater alebo všeobecný lekár, preto je nevyhnutné byť oboznámený s touto problematikou a vedieť znaky tohto ochorenia efektívne diagnostikovať.

Prítomnosť depresie alebo depresívnej epizódy u pacienta hodnotíme podľa rôznych somatických a psychických faktorov, ako aj pomocou hodnotiacich testov. Depresívne poruchy kategorizujeme podľa MKCH-10 alebo DSM-5, ktoré sa však nezhodujú v mnohých aspektoch. Zavedením novej MKCH-11 sa plánuje tieto rozdiely zmierniť a prípadne klasifikácie aj zlúčiť. Depresívna porucha, spolu s bipolárnou poruchou patria medzi afektívne poruchy. Táto kategória obsahuje rôzne diagnózy súvisiace s pretrvávajúcimi a premenlivými poruchami nálady a emotivity.

Neuropeptidy a hormóny sa podieľajú na regulácii mnohých fyziologických funkcií. Niektoré pôsobia ako neuromodulátory a často sú vylučované spolu s neurotransmitterom, čo umožňuje recipročnú komunikáciu medzi mozgom a telom. Neuropeptidy boli v minulosti študované pre ich možné antidepresívne a anxiolytické účinky, ako napríklad oxytocín alebo vazopresín. Najnovší výskum prozápalových cytokínov ukazuje, že ich vzťah s etiológiou depresie môže byť kauzálny. Pri depresii existujú silnejšie cytokínové reakcie na patogény a stresory. Pri kombinácii s inými predispozičnými faktormi vedú tieto reakcie k predĺženým zápalovým procesom a predĺženej deregulácii rôznych osí. Tieto zmeny majú za následok výskyt stresu, bolesti, zmien nálad, úzkosti a depresie. Vplyv oxidatívneho stresu na etiológiu depresie je dlhodobo skúmaný a dáta z posledných rokov ukazujú, že samotné antioxidanty ako vitamín E, zinok, glutatión alebo koenzým Q10 sú markermi a ich pozmenený stav alebo nerovnováha je napravitelná úspešnou terapiou antidepresívami. Avšak, žiadne z týchto molekúl nie sú izolované od komplexných patofyziologických mechanizmov depresie alebo iných psychiatrických porúch. Jednotlivé signálne dráhy a efekty čiastkových procesov iba dopĺňajú tento zložitý systém regulácie.

Melanokortíny

Melanokortíny sú skupinou peptidových hormónov odvodených od proopiomelanokortínu (POMC). Táto skupina zahŕňa adrenokortikotropný hormón (ACTH), alfa-, beta- a gama-melanocyty stimulujúce hormóny (MSH), beta-endorfín, intermediárny peptid podobný kortikotropínu (CLIP) a fragment adrenokortikotropného hormónu. Melanokortínové receptory sú spojené s obezitou, erektilnou dysfunkciou, kachexiou, bolesťou, depresiou a úzkosťou. Melanokortíny pôsobia prostredníctvom piatich melanokortínových receptorov, sú to GPCR identifikované ako MC1 až 5. Doteraz boli s úzkosťou a depresiou spojené iba MC3R a MC4R s ich ligandom, alfa-MSH (v prípade MC3R aj gama-MSH) [1]. Hlavné miesta expresie melanokortínových neurónov sa nachádzajú v mozgovom kmeni a hypotalame, v nucleus arcuatus (ARC), ktoré úzko komunikujú s neurónmi exprimujúcimi AgRP a Neuropeptid Y (NPY), čo naznačuje ich účasť v tomto systéme. V literatúre sa uvádza, že alfa-MSH potláča účinky NPY, čím znižuje jeho antidepresívny účinok. Podávanie antagonistu alfa-MSH s NPY vykazuje synergický anxiolytický účinok [2]. Inhibícia MC4 receptorov v dorzálnom nucleus raphe (DRN) pomocou alfa-MSH vyvoláva úzkosť a depresiu a znižuje hlad u myší. Kruh regulácie v

melanokortínovom systéme uzatvára antagonista receptora Agouti-related peptid (AgRP) s orexigénnym účinkom. Chronické podávanie stravy s vysokým obsahom tukov otupuje odpoveď AgRP na signály úzkosti a depresie, ako aj hlad znížením GABA-ergických výstupov z AgRP zameraného na MC4R. Avšak GABA-ergická stimulácia a supresia 5-HT3R v MC4R neurónoch v jadre talamu spôsobuje zastavenie účinku úzkosti a depresie vyvolanej diétou s vysokým obsahom tukov. Kombinovaný účinok tiež znižuje príjem potravy a tým aj telesnú hmotnosť. Tieto zistenia naznačujú, že spočiatku AgRP reguluje chuť do jedla, ale neskôr so stratou účinku sú MC4R pravdepodobnejšou možnosťou pre ďalší výskum liečby úzkosti a depresie.

Špecifickým regulačným proteínom, ktorý ovplyvňuje melanokortínový systém, je faktor inhibujúci uvoľňovanie hormónu stimulujúceho melanocyty (MIF-1) s jeho analógom Nemifitid. Obidva vykazujú nízku afinitu k μ -opioidným receptorom a fungujú ako blokátory uvoľňovania alfa-MSH, čím sa znižuje jeho inhibičný účinok na NPY. Predklinické štúdie preukázali účinky na depresívnu poruchu, ale na preukázanie jeho účinnosti je potrebný ďalší výskum tohto konkrétneho peptidu.

Kortikoliberín uvoľňujúci hormón

Kortikoliberín uvoľňujúci hormón (CRH) je tiež známy ako faktor uvoľňujúci kortikotropín (CRF); z dôvodov presného názvoslovie sa však ďalej bude používať výraz CRH. CRH je centrálnym regulátorom osi HPA, ktorá je hlavným organizátorom reakcie organizmu na stres. CRH pozostáva zo 41 aminokyselín a viaže sa na dva GPCR: a to CRHR1 a CRHR2. Oba sú v centrálnom nervovom systéme a R2 aj v periférnych tkanivách. CRH receptory sú exprimované v hypofýze, amygdale, hipokampe, mozgovom kmeni a cingulárnej kôre. Systém CRH pozostáva zo samotného CRH, potom urokortínu 1, 2 a 3, ktoré všetky slúžia ako ligandy pre CRH receptory [3]. Účinky tohto systému nespočívajú len v sprostredkovaní reakcií súvisiacich so stresom, ale aj v regulácii zápalu. Úzky vzťah k bolesti súvisiacej so zápalom je založený na makrofágoch, monocytoch a žirných bunkách, pretože všetky exprimujú oba CRH receptory, a teda slúžia ako ciele tohto systému [4]. Systém CRH-HPA môže mať neblahý vplyv na ľudský organizmus, preto nie je prekvapujúce, že mnohé štúdie na ľuďoch a zvieratách uvádzajú účinok CRH na reguláciu osi HPA. Chronický stres aktivuje signalizáciu súvisiacu s CRH v jadre talamu a indukuje maladaptívne správanie u myši [5]. Táto skutočnosť je v súlade s pozorovanou dysfunkciou osi HPA u pacientov s depresiou alebo schizofréniou, kde kontinuálny účinok CRH na os HPA spôsobuje nerovnováhu (zvýšený kortizol, zvýšený ACTH, znížená spätná väzba) a vedie k patológii [6]. Na túto nerovnováhu sa zameriavajú antidepresíva, ktoré majú po určitom čase potenciál zvrátiť zmeny v hyperaktivácii osi HPA. Systém CRH je dlho spájaný s emočnou nerovnováhou, zmenami správania, úzkosťou a depresiou. Varianty génu CRHR1 sa spájajú s vyššou náchylnosťou na depresiou alebo panickú poruchu. Pohlavne špecifická stresová reakcia u žien bola pozorovaná na zvieracom modeli, pričom pohlavné hormóny ovplyvňovali reguláciu CRH. V myšiach s indukovanou expresiou CRH bola sledovaná hyperaktivácia osi HPA a zvýšenie procesov a správania sprostredkovaných stresom, ktoré je možné liečiť antagonistami CRHR1.

Ďalšími členmi rodiny CRH sú urokortíny. Urokortíny 1, 2 a 3 sú skupinou troch peptidov (UCN1, UCN2 a UCN3). UCN1 je 40-aminokyselinový peptid, zatiaľ čo UCN2 a 3 sú paralógne 38-aminokyselinové peptidy, ktoré sa viažu na CRHR2. UCN1 je produkovaný hypotalamom, substantia nigra a hypofýzou a má vysokú afinitu k obidvom CRH receptorom, čo naznačuje jeho úlohu v správaní a zaujímavo aj regulácii príjmu potravy. Intracerebrovaskulárna injekcia UCN1 má anxiogénne a „antisociálne“ účinky

antagonizovateľné antagonistami CRHR1. Avšak samotný antagonist CRHR1 nemal žiadne účinky na sociálnu interakciu, ale znižoval pokles sociálnej interakcie vyvolaný stresom alebo UCN1 [7].

Najnovšími členmi spojenými s rodinou CRH sú štyri teneuríny alebo teneurínové C-terminálne spojené peptidy (TACP), ktoré zdieľajú homológiu s aminokyselinovou sekvenciou CRH a viažu sa na latrofilíny (skupina vysoko konzervovaných GPCR). Ich účinok je tkanivovo špecifický a správy ukazujú schopnosť TACP-1 znižovať úzkosť, závislosť a depresiu pri správaní vyvolanom stresom [8]. Na druhej strane štúdie a predklinické modely tiež ukazujú zmiešané výsledky. V niektorých prípadoch majú antagonisy receptora CRH alebo TACP rôzne účinky na úzkosť, ale je to aj v závislosti od testu, pretože tieto terapeutiká nefungujú pri bazálnych podmienkach. Ak sú však prítomné symptómy alebo signalizácia súvisiace s depresiou alebo úzkosťou, tieto terapeutiká majú významný účinok. Inými slovami, na to, aby antidepresíva a anxiolytiká účinkovali, musí byť prítomný stresor (depresia alebo úzkosť). Tieto závery nie sú prekvapujúce, pretože urokortíny a ich nadmerná expresia u jedincov s deficitom CRH sú často indukované ako kompenzačný mechanizmus v neprítomnosti CRH. Rovnaký výsledok je pre modely s nadmernou expresiou CRH antagonizovateľnou antagonistami CRHR1, kde niektoré línie vykazujú vyššiu úzkosť a zraniteľnosť voči stresu, ale v iných líniiach, ktoré tieto črty nevykazujú, sa zistila znížená koncentrácia UCN1.

Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY), 36-aminokyselinový neuropeptid, má širokú distribúciu v centrálnom nervovom systéme (CNS) s napojením na melanokortínový systém. NPY patrí k evolučne najkonzervovanejšim proteínom. V minulosti boli hladiny NPY spojené s afektívnymi poruchami a namerané plazmatické hladiny boli nízke u pacientov s depresiou vedúcou k suicídiu. Účinok NPY prostredníctvom jeho receptorov zhodnotil Morales-Medina et al. so záverom, že zvieracie modely na receptoroch Y1 a Y2 poskytli veľmi dôležité údaje o ich úlohe v emočných reakciách a strese [9]. Nedávna štúdia na myšacom modeli preukázala, že NPY pri depresii zvyšuje hladiny IL6 a podporuje infiltráciu myeloidných buniek [10]. Na inom animálnom modeli bolo pozorované správanie podobné depresii spojené so zníženou expresiou NPY v hypotalame a hipokampe. NPY je čiastočne spojený s HPG osou cez kisspeptínové neurónové vlákna na ARC neurónoch, ktoré exprimujú POMC. Najnovšia štúdia sledovala transkripčné a translačné hladiny NPY receptorov v prefrontálnom kortexe a hipokampe fyziologických mozgov (kontrolné subjekty) a subjektov po suicídiu (študijná skupina) [11]. V oboch častiach mozgu bol v študovanej skupine pozorovaný významný pokles mRNA NPY a tiež upregulácia Y1R a Y2R mRNA spolu s výrazným znížením expresie NPY proteínu v prefrontálnom kortexe študovanej skupiny [12].

Proteíny galanínovej rodiny

Galanín (GAL) predstavuje u ľudí 30-aminokyselinový neuropeptid. Medzi členov tejto rodiny patria aj peptid spojený s galanínom (GMAP) a GAL (1–15), galanínový N-terminálny fragment [13]. Ďalšími členmi rodiny galanínov sú peptid podobný galanínu – GALP (kódovaný génom GALP) – a alarín (kódovaný zostrihovým variantom GALP). Členovia rodiny galanínov sa viažu na špecifické GPCR – GALR1, GALR2 a GALR3, z ktorých, aspoň u hlodavcov, sú R1 prevažne centrálné exprimované a R2 a R3 sú v centrálnych aj periférnych tkanivách.

GAL je „multitalentovaný peptid“, ktorý sa podieľa na širokej sieti funkcií, ako je regulácia kŕmenia, učenia a pamäte, ako aj nocicepcie a zmien nálady a správania, čo

predstavuje potenciálny terapeutický cieľ pre afektívne poruchy alebo drogové závislosti. GAL sa exprimuje v centrálnom aj periférnom nervovom systéme, gastrointestinálnom trakte a endokrinných orgánoch, pričom účinky dosahujú až na procesy, ako je kontrola prolaktínu, rastového hormónu a uvoľňovania luteinizačného hormónu. V centrálnom nervovom systéme je GAL koexprimovaný so serotonínom a norepinefrínom, z ktorých oba sa podieľajú na etiológii depresívnej poruchy. Mikroinjekcie 3 nmol galanínu do dorzálnnej šedej hmoty spôsobili inhibíciu získaných reakcií podobných úzkosti. Zistilo sa však, že GALR1 a GALR2 majú opačný účinok na úzkosť, prvé ju podporujú, druhé znižujú [14]. Korelácia medzi depresiou a plazmatickými hladinami GAL sa však ukázala ako pozitívna len u žien. Zvýšená expresia GALR1 v prefrontálnom kortexe bola zvýšená v modeli postnatálnej depresie, zatiaľ čo expresia 5-HT a 5-HIAA bola znížená [15]. Keďže prefrontálny kortex je dôležitou súčasťou mozgu ovplyvňujúcou náladu a správanie, zdá sa, že galanín môže hrať dôležitú úlohu v tejto patológii. Toto spojenie môže byť viazané na bolesť, keďže chronická bolesť vedie k zmenám nálady a správania, a teda k súbežnému pocitu úzkosti a depresie. V reakcii na zápal a bolesť u hlodavcov sú expresie receptorov typu 1 a 2 v nucleus accumbens upregulované, čo túto teóriu potvrdzuje [16].

Galanín (1–15) vo výskume spôsobuje zosilnenie antidepresívnych účinkov indukovaných 5-HT_{1A}R agonistom, čo by mohlo mať významný diagnostický potenciál zameraný na interakciu receptorov galanín-serotón [17]. Niektoré práce poukazujú na skutočnosť, že GAL má silnejšiu aktiváciu signalizácie prostredníctvom GALR2, zatiaľ čo GAL (1–15) má vysokú afinitu k heteroreceptorom GALR1-2 a táto nerovnováha v signalizácii by mohla viesť k účinkom podobným depresii.

GALP je 60-aminokyselinový peptid s homológnu sekvenciou ku galanínu, ktorá umožňuje väzbu a aktiváciu všetkých troch GAL receptorov. GALP je však takmer výlučne exprimovaný v ARC a zadnej hypofýze. Doteraz nebol spojený s úzkosťou alebo depresiou. Alarín sa neviaže na GAL receptory, čo znamená, že jeho funkcia je sprostredkovaná cez receptor špecifický pre alarín a tento ešte nebol objavený.

Spexín

Spexín (SPX) alebo neuropeptid Q (NPQ) je endogénny neuropeptid pozostávajúci zo 14 aminokyselín vo svojej aktívnej forme. SPX sa produkuje v pankrease a dodnes nepoznáme jeho špecifický receptor. Zistilo sa však, že interaguje s galanínovými receptormi GALR2 a GALR3. Prítomnosť SXP v CNS a endokrinných, gastrointestinálnych, močových a reprodukčných orgánoch bola zaznamenaná u viacerých druhov, čo naznačuje široké spektrum dráh spojených s týmto neuropeptidom [18]. Agonista GALR2 na báze spexínu vyvolal anxiolytický účinok u myši po intracerebroventrikulárnom podaní. Štúdia na potkanoch od Palasza et al. ukázala, že predĺžené intraperitoneálne podávanie escitalopramu spôsobilo upreguláciu génu SPX v hipokampe a striate, zatiaľ čo expresia v hypotalame bola znížená. Následná štúdia toho istého tímu zistila, že predĺžené intraperitoneálne podávanie haloperidolu a chlórpromazínu zvýšilo expresiu mRNA SPX a proopiomelanokortínu (POMC) v potkanej amygdale, zatiaľ čo expresia mRNA kisspeptínu-1 sa znížila [19]. Všetky vyššie uvedené výsledky naznačujú anxiolytický, antidepresívny a antipsychotický účinok dráh súvisiacich so SPX v amygdale [20].

Štúdie na zvieratách o účinkoch spexínu pri úzkosti a depresii poukazujú na spojenie medzi SPX a CRH systémom, zatiaľ čo systém CRH má známe spojenie so serotonergným systémom. Bolo zistené 3,5-násobné zvýšenie expresie CRH mRNA a o 30% nižšia SPX mRNA expresia u myši extenzívne vystavených nepredvídateľnému stresu. Tento účinok sa prehlbuje injekciou CRH do hipokampu prostredníctvom CRHR2 [21].

Substancia P

Substancia P (SP) je 11-aminokyselinový neuropeptid z rodiny tachykinínov, ktorý obsahuje neurokiníny A a B spolu s hemokinínom-1. Tachykiníny zdieľajú tri neurokinínové receptory, NK-1R, NK-2R a NK-3R (tiež známe ako TACR1; TACR2; a TACR3). Substancia P je prítomná v centrálnom nervovom systéme a primárne sa vylučuje v amygdale, hipokampe a v prednom mozgu, ale bunky spojené so zápalovými procesmi tiež vykazujú schopnosť jej sekrécie. Zistilo sa, že substancia P interaguje so serotonergným, dopamínerným a noradrenergným systémom, čo ju spája s mnohými biologickými procesmi, ako sú napríklad regulácia stresu, nocicepcia alebo regulácia homeostázy. Keďže tieto systémy hrajú významnú úlohu v patofyziológii depresie, existuje možnosť použitia SP ako biomarkera pri depresívnych poruchách a úzkosti. Predpokladá sa, že SP sa podieľa na aktivácii sympatikového systému a osi HPA pri reakciách na stresory [22]. Uvedené fakty podporujú poznatky, že centrálna podávanie substancie P a NK-1R (neurokinínový receptor typu 1) vedie u zvierat k depresii a úzkosti podobnému správaniu, zatiaľ čo antagonista NK-1R spôsobujú anxiolytické účinky [23]. U ľudí s depresiou boli v porovnaní so zdravými pacientami identifikované zvýšené hladiny substancie P v sére a po liečbe sa pozorovalo zníženie týchto hladín. Ukázalo sa, že antagonista NK-1R majú antidepresívne účinky a tiež znižujú aktivitu neurónov v oblastiach mozgu zapojených do reakcie na stres. Nedávna štúdia o expresii NK-1R u pacientov trpiacich depresívnou poruchou však nezistila žiadnu koreláciu v porovnaní s kontrolami [24]. Aj keď antagonista NK-1R receptora boli primárne vytvorené ako antidepresíva, ktoré vykazovali niekedy zmiešané, ale väčšinou sľubné výsledky v liečbe depresie a úzkosti, ich ďalšími študovanými účinkami sú antiemetické a antipruritické [25].

Záver

Cieľom tejto práce bolo prehľadne a stručne spracovať problematiku významných neuropeptidov v úzkostnej a depresívnej poruche. Ich budúcnosti v oblasti manažmentu pacienta. Dôležitým faktorom sú aj hladiny expzie neuropeptidov a ich vplyv na rôzne druhy správania a taktiež možné ovplyvnenia týchto kaskád pomocou agonistov alebo antagonistov. Doterajšie výsledky sa zdajú byť u mnohých štatisticky významné.

Diagnostika a liečba úzkostnej alebo depresívnej poruchy môže byť pre lekára ťažkosťou a tiež výzvou. Lekári prvého kontaktu potrebujú metódy, ktorými by týchto pacientov vedeli exaktne zachytiť a tak im zabezpečiť skoršiu a efektívnejšiu liečbu. Anamnesticky dôležité informácie sú symptómy a škály osobného hodnotenia. Tiež objektívne subdepresívne ladenie alebo lakrimozita. Často je nutné získať až do hlbšej histórie pacienta, nájsť tzv. spúšťače a udalosti v živote, ktoré k depresii prispievajú a snažiť sa ich adresovať.

Zoznam použitej literatúry

1. Nyamugenda, E.; Griffin, H.; Russell, S.; Cooney, K.A.; Kowalczyk, N.S.; Islam, I.; Phelan, K.D.; Baldini, G. Selective Survival of Sim1/MC4R Neurons in Diet-Induced Obesity. *iScience* **2020**, *23*, 101114.
2. Kokare, D.M.; Dandekar, M.P.; Chopde, C.T.; Subhedar, N. Interaction between Neuropeptide Y and Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone in Amygdala Regulates Anxiety in Rats. *Brain Research* **2005**, *1043*, 107–114.
3. Vuppalahadham, L.; Ehsan, C.; Akkati, M.; Bhargava, A. Corticotropin-Releasing Factor Family: A Stress Hormone-Receptor System's Emerging Role in Mediating Sex-Specific Signaling. *Cells* **2020**, *9*, 839.
4. Tapp, Z.M.; Godbout, J.P.; Kokiko-Cochran, O.N. A Tilted Axis: Maladaptive Inflammation and HPA Axis Dysfunction Contribute to Consequences of TBI. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 345.

5. Hu, P.; Liu, J.; Maita, I.; Kwok, C.; Gu, E.; Gergues, M.M.; Kelada, F.; Phan, M.; Zhou, J.-N.; Swaab, D.F.; et al. Chronic Stress Induces Maladaptive Behaviors by Activating Corticotropin-Releasing Hormone Signaling in the Mouse Oval Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *J. Neurosci.* **2020**, *40*, 2519–2537.
6. Mikulska, J.; Juszczak, G.; Gawrońska-Grzywacz, M.; Herbet, M. HPA Axis in the Pathomechanism of Depression and Schizophrenia: New Therapeutic Strategies Based on Its Participation. *Brain Sciences* **2021**, *11*, 1298.
7. de Groote, L.; Penalva, R.G.; Flachskamm, C.; Reul, J.M.H.M.; Linthorst, A.C.E. Differential Monoaminergic, Neuroendocrine and Behavioural Responses after Central Administration of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 1 and Type 2 Agonists. *J Neurochem* **2005**, *94*, 45–56.
8. Woelfle, R.; D'Aquila, A.L.; Pavlović, T.; Husić, M.; Lovejoy, D.A. Ancient Interaction between the Teneurin C-Terminal Associated Peptides (TCAP) and Latrophilin Ligand-Receptor Coupling: A Role in Behavior. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*.
9. Morales-Medina, J.C.; Dumont, Y.; Quirion, R. A Possible Role of Neuropeptide Y in Depression and Stress. *Brain Research* **2010**, *1314*, 194–205.
10. Cheng, Y.; Tang, X.-Y.; Li, Y.-X.; Zhao, D.-D.; Cao, Q.-H.; Wu, H.-X.; Yang, H.-B.; Hao, K.; Yang, Y. Depression-Induced Neuropeptide Y Secretion Promotes Prostate Cancer Growth by Recruiting Myeloid Cells. *Clinical Cancer Research* **2019**, *25*, 2621–2632.
11. Carboni, L.; El Khoury, A.; Beiderbeck, D.I.; Neumann, I.D.; Mathé, A.A. Neuropeptide Y, Calcitonin Gene-Related Peptide, and Neurokinin A in Brain Regions of HAB Rats Correlate with Anxiety-like Behaviours. *European Neuropsychopharmacology* **2022**, *57*, 1–14.
12. Sharma, A.; Ren, X.; Zhang, H.; Pandey, G.N. Effect of Depression and Suicidal Behavior on Neuropeptide Y (NPY) and Its Receptors in the Adult Human Brain: A Postmortem Study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **2022**, *112*, 110428.
13. Mills, E.G.; Izzi-Engbeaya, C.; Abbara, A.; Comninos, A.N.; Dhillon, W.S. Functions of Galanin, Spexin and Kisspeptin in Metabolism, Mood and Behaviour. *Nat Rev Endocrinol* **2021**, *17*, 97–113.
14. Morais, J.S.; Souza, M.M.; Campanha, T.M.N.; Muller, C.J.T.; Bittencourt, A.S.; Bortoli, V.C.; Schenberg, L.C.; Beijamini, V. Galanin Subtype 1 and Subtype 2 Receptors Mediate Opposite Anxiety-like Effects in the Rat Dorsal Raphe Nucleus. *Behavioural Brain Research* **2016**, *314*, 125–133.
15. Li, H.; Wang, T.; Shi, C.; Yang, Y.; Li, X.; Wu, Y.; Xu, Z.-Q.D. Inhibition of GALR1 in PFC Alleviates Depressive-Like Behaviors in Postpartum Depression Rat Model by Upregulating CREB-BDNF and 5-HT Levels. *Front. Psychiatry* **2018**, *9*, 588.
16. Zhang, Y.; Gao, Y.; Li, C.-Y.; Dong, W.; Li, M.-N.; Liu, Y.-N.; Dong, Y.; Xu, S.-L. Galanin Plays a Role in Antinociception via Binding to Galanin Receptors in the Nucleus Accumbens of Rats with Neuropathic Pain. *Neuroscience Letters* **2019**, *706*, 93–98.
17. Millón, C.; Flores-Burgess, A.; Narváez, M.; Borroto-Escuela, D.O.; Gago, B.; Santín, L.; Castilla-Ortega, E.; Narváez, J.Á.; Fuxe, K.; Díaz-Cabiale, Z. The Neuropeptides Galanin and Galanin(1–15) in Depression-like Behaviours. *Neuropeptides* **2017**, *64*, 39–45.
18. Sassek, M.; Kolodziejewski, P.A.; Szczepankiewicz, D.; Pruszyńska-Oszmalek, E. Spexin in the Physiology of Pancreatic Islets—Mutual Interactions with Insulin. *Endocrine* **2019**, *63*, 513–519.
19. Pałasz, A.; Pałka, M.; Filipczyk, Ł.; Menezes, I.C.; Rojczyk, E.; Worthington, J.J.; Piwowarczyk-Nowak, A.; Krzystanek, M.; Wiaderkiewicz, R. Effect of Long-Term Treatment with Classical Neuroleptics on NPQ/Spexin, Kisspeptin and POMC MRNA Expression in the Male Rat Amygdala. *J Neural Transm* **2018**, *125*, 1099–1105.
20. Lv, S.-Y.; Zhou, Y.-C.; Zhang, X.-M.; Chen, W.-D.; Wang, Y.-D. Emerging Roles of NPQ/Spexin in Physiology and Pathology. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 457.
21. Zhuang, M.; Lai, Q.; Yang, C.; Ma, Y.; Fan, B.; Bian, Z.; Lin, C.; Bai, J.; Zeng, G. Spexin as an Anxiety Regulator in Mouse Hippocampus: Mechanisms for Transcriptional Regulation of

- Spexin Gene Expression by Corticotropin Releasing Factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, 525, 326–333.
22. Iftikhar, K.; Siddiq, A.; Baig, S.G.; Zehra, S. Substance P: A Neuropeptide Involved in the Psychopathology of Anxiety Disorders. *Neuropeptides* **2020**, 79, 101993.
 23. Borbély, É.; Hajna, Z.; Nabi, L.; Scheich, B.; Tékus, V.; László, K.; Ollmann, T.; Kormos, V.; Gaszner, B.; Karádi, Z.; et al. Hemokinin-1 Mediates Anxiolytic and Anti-Depressant-like Actions in Mice. *Brain, Behavior, and Immunity* **2017**, 59, 219–232.
 24. Nyman, M.; Eskola, O.; Kajander, J.; Jokinen, R.; Penttinen, J.; Karjalainen, T.; Nummenmaa, L.; Hirvonen, J.; Burns, D.; Hargreaves, R.; et al. Brain Neurokinin-1 Receptor Availability in Never-Medicated Patients with Major Depression – A Pilot Study. *Journal of Affective Disorders* **2019**, 242, 188–194.
 25. He, A.; Alhariri, J.M.; Sweren, R.J.; Kwatra, M.M.; Kwatra, S.G. Aprepitant for the Treatment of Chronic Refractory Pruritus. *BioMed Research International* **2017**, 2017, 1–6.

Terapeutický potenciál bioaktívnych molekúl secernovaných kmeňovými bunkami zubnej drene

Dana IVANIŠOVÁ¹, Dušan Hollý², Martin BOHÁČ¹

¹Regenmed spol. s r. o., Medená 29, 811 02 Bratislava; ²Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Heydukova 10, 812 50 Bratislava

Súhrn

Relatívne nedávno bol objavený alternatívny zdroj mezenchymálnych kmeňových buniek (MSCs) - kmeňové bunky zubnej drene (DPSCs), získané z mliečnych a dospelých zubov, ktoré môžu predstavovať potenciálne nástroje pre regeneratívnu medicínu. DPSCs pochádzajú z neurálnej lišty a normálne sa podieľajú na homeostáze dentínu. Klinická aplikácia MSCs zahŕňajúca aj DPSCs je ovplyvnená rôznymi obmedzeniami, ako sú vysoké náklady, nízka bezpečnosť a problémy s manipuláciou s bunkami, ako aj invazívne postupy odberu vzoriek. Hoci implantácia MSCs ponúka priaznivé výsledky pri špecifických ochoreniach, implantované MSCs nemôžu prežiť dlhú dobu. Predpokladá sa teda, že ich sprostredkovaný mechanizmus účinku zahŕňa parakrinné účinky. V tomto prehľade sa zameriavame na opis charakteristík kondicionovaných médií pripravených z DPSCs (DPSC-CM) a ich terapeutického potenciálu v regeneratívnej medicíne.

Kľúčové slová: kmeňové bunky zubnej drene, secernované faktory, regenerácia, imunomodulácia

Important neuropeptides in the context of anxiety and depressive disorders

Summary

Relatively recently, an alternative source of mesenchymal stem cells (MSCs) - dental pulp stem cells (DPSCs), obtained from deciduous and adult teeth has been discovered, which may represent potential tools for regenerative medicine. DPSCs originate from the neural crest and are normally involved in dentin homeostasis. The clinical application of MSCs, including DPSCs, is affected by various limitations, such as high cost, low safety and cell handling problems, as well as invasive sampling procedures. Although the implantation of MSCs offers favorable results in specific diseases, the implanted MSCs cannot survive for a long time. Thus, their mediated mechanism of action is thought to involve paracrine effects. In this review, we focus on describing the characteristics of conditioned media prepared from DPSCs (DPSC-CM) and their therapeutic potential in regenerative medicine.

Keywords: dental pulp stem cells, secreted factors, regeneration. immunomodulation

Úvod

Mikroprostredie ústnej dutiny, ktoré tvoria zuby, ďasná a jazyk, je jedným z najšpecializovanejších útvarov kraniofaciálneho skeletu a tvorí výborný vývojový model tvorby orgánov. Okrem toho táto komplexná a sofistikovaná štruktúra ponúka veľký potenciál pre regeneratívnu medicínu vďaka bohatým zdrojom rôznych typov MSCs. Zdá sa, že najnovšie objavené kmeňové bunky v repertoári mezenchymálnych kmeňových buniek,

DPSCs, majú obrovský potenciál pre vývojové, diferenciačné, regeneračné a imunomodulačné vlastnosti [1].

DPSC pochádzajúce z detskej alebo dospeljej ľudskej zubnej drene boli pôvodne objavené Gronthosom a kolegami v roku 2000 [2]. DPSCs boli izolované na základe vysokej proliferácie a frekvencie kolonizácie, pričom produkovali sporadické, ale husto kalcifikované zhluky. Okrem toho sa DPSCs významne nelíšia od MSCs odvodených z tukového tkaniva, kostnej drene a tkaniva pupočníka, pokiaľ ide o ich povrchové markery – sú pozitívne na CD29, CD90, CD105, CD73 a CD44 a negatívne na markery hematopoetických a endotelových buniek (CD14, CD34 a CD45). Vykazujú aj podobnú dferenciačnú kapacitu [1].

Je známe, že MSCs sa podieľajú na raste, hojení rán a náhrade buniek za normálnych aj patologických stavov. Tieto bunky preukázali účinnosť pri regenerácii periodontálneho tkaniva, ischemického tkaniva končatín, poškodenia kostí vyvolaného osteonekrózou, kožných lézií po popáleninách, atď. K dnešnému dňu sa uskutočnilo veľa predklinických experimentov aj s použitím DPSCs a existujú informácie, že DPSC sa diferencujú na rôzne bunky, napr. nervové bunky, dopaminergné neuróny, myotuby, bunky podobné hepatocytom a keratocyty [3]. Neexistujú však žiadne správy o rozsiahlych klinických štúdiách. Problémom pri používaní kmeňových buniek je riziko rozvoja rakoviny a potreba špeciálnych zariadení na spracovanie buniek [4].

Rôzne predchádzajúce štúdie ukázali, že transplantované bunky môžu mať viaceré a významné úlohy, môžu nielen migrovať v tkanivách hostiteľa a priamo sa podieľať na regenerácii tkaniva, ale môžu mať aj parakrinné účinky (obr. 1). DPSC produkujú cytokíny, ktoré môžu znížiť zápal, zvýšiť proliferáciu progenitorových buniek, zlepšiť opravu tkaniva a znížiť infekciu účinnejšie v porovnaní s MSC derivovanými z kostnej drene [5]. Cieľom tohto prehľadu je teda poukázať na terapeutický účinok secernovaných faktorov z DPSC na rôzne ochorenia, ako aj na mechanizmus ich účinku.

Bioaktívne molekuly secernované DPSCs

Predchádzajúce výskumy ukázali, že DPSC-kondicionované médiá (DPSC-CM) obsahujú rôzne bioaktívne molekuly. Ukázalo sa že sú signifikatne lepším zdrojom protizápalových cytokínov ako BMMSC-kondicionované médiá. Produkujú napr. interleukín 10 (IL-10), IL-13, follistátin, transformujúci rastový faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Okrem toho produkujú aj rastový faktor hepatocytov (HGF), adhéziu molekulu nervových buniek 1 (NCAM-1), adiponektín, matrixovú metaloproteinázu 13 (MMP-13), neurotrofin 3 (NT-3), neurotrofický faktor odvodený z mozgu (BDNF) a MMP-9 [6].

Vzťah medzi DPSC-CM a exozómami

DPSC-CM obsahuje predovšetkým cytokíny a nepatrný počet exozómov sekretovaných DPSCs. Preto sa predpokladá, že DPSC-CM je neimunogénny, čo podporuje ich použitie u rovnakého alebo iného živočíšneho druhu. Mechanizmus pôsobenia secernovaných faktorov reguluje najmä rovnováhu medzi týmito protizápalovými a prozápalovými cytokínmi v konkrétnom tkanive.

Za exozómy sa označujú špecifické extracelulárne vezikuly s priemerom 40–150 nm. Následne môžu byť exozómy internalizované inými bunkami, najmä fagocytózou a fúziou s bunkovou membránou a interakciou receptor-ligand, čo im umožňuje uvoľniť ich obsah do cytoplazmy. Regeneračný potenciál exozómov môže byť modulovaný rôznymi mechanizmami, vrátane predchádzajúcej expozície pôvodnej bunkovej populácie vonkajším stimulom [7]. Primárne funkčné molekuly exozómov však zostávajú nejasné a v súčasnosti neexistuje jednotné dávkovanie, spôsob podávania alebo skladovacia schéma pre bezbunkové

terapiu, preto je na vyriešenie týchto problémov potrebný ďalší systematický a rozsiahly výskum.

Terapeutický význam kondicionovaných médií

Ischemické choroby srdca, ako napríklad infarkt myokardu (IM), patria medzi hlavné príčiny úmrtí na celom svete. IM zvyčajne vedie k ireverzibilnému poškodeniu tkanív srdca a súvisiaca mortalita a morbidita zostávajú vysoké aj napriek pokrokom v medicíne. Vývoj účinných doplnkových terapií pre pacientov s IM je preto stále nevyhnutný. Bolo preukázané, že podávanie DPSC-CM znížilo rizika IM a zvýšilo srdcovú funkciu u myši po ischemickej reperfúzii. To korelovalo s ischemickou apoptózou srdca a zníženým zápalom [8,9]. Yamaguchi a kol. ukázali, že DPSC-CM indukuje prežitie kardiomyocytov ako odpoveď na hypoxiu a sérovú depriváciu a že DPSC-CM znižuje expresiu prozápalových mediátorov podporovaných lipopolysacharidom [8]. Podávanie DPSC-CM tak môže chrániť srdce pred ischemickým poškodením aspoň dvoma mechanizmami sprostredkujúcimi zníženie apoptózy kardiomyocytov a potlačenie zápalových reakcií v bunkách myokardu.

Existuje niekoľko štúdií týkajúcich sa terapie CNS kondicionovanými médiami [10,11]. Aplikácia DPSCs podporuje funkčné zotavenie z rôznych akútnych a chronických inzultov CNS prostredníctvom parakrinných mechanizmov, ktoré indukujú endogénne aktivity na opravu tkaniva [12]. Mŕtvica je celosvetovo treťou najčastejšou príčinou smrti a najčastejšou príčinou dlhodobej invalidity u ľudí. Nedávno sa ukázalo, že transplantácia mononukleárných buniek kostnej drene dosahuje klinickú účinnosť podporou angiogenézy u pacientov s cerebrálnou ischémiou [13]. Na zvieracom modeli fokálnej cerebrálnej ischémie, DPSC-CM a BMMSC-CM rovnako inhibovali expresiu prozápalových cytokínov a markerov oxidatívno-nitrozatívneho stresu. Naopak, DPSC-CM selektívne aktivoval mikrogliu typu M2, čo viedlo k expresii mRNA kódujúceho BDNF, neurotrofinu, ktorý má kľúčovú úlohu v synaptickej remodelácii korelovanej s rozvojom pamäte v dospelom hipokampe [14]. Na modeli potkanov aneuryzmálneho subarachnoidálneho krvácania (aSAH) sa pozoroval potenciálny synergický účinok DPSC-CM. Pozorovali sa najmä vysoké hladiny tkanivového inhibítora metaloproteináz (TIMP-2) v DPSC-CM, ktoré sú kľúčové pre udržanie tkanivovej homeostázy [10].

Akútne zlyhanie pečene (AZP), ktoré môže byť spôsobené rôznymi vplyvmi, ako sú lieky, vírusy a ischemiotoxíny, môže viesť k masívnej deštrukcii hepatocytov a neobmedzenej zápalovej odpovedi. Hoci pečeň má vysokú regeneračnú kapacitu, pri chronickom poškodení sa mnohokrát nedá dosiahnuť jej regenerácia a mnohokrát môže viesť ku smrti. Na potkaních modeloch AZP sa zistilo, že BMMSC-CM má terapeutický účinok [15]. Matsushita a kol. navrhol využitie DPSC-CM pre potreby liečby AZP [16]. Ďalej bolo zistené, že HGF ako multifunkčný proteín, zabraňuje apoptóze hepatocytov, indukuje proliferáciu progenitorových buniek pečene a podporuje neovaskularizáciu [17]. Faktory kmeňových buniek (SCF) inhibujú hepatickú apoptózu pri AZP [18]. Proteín viažuci rastový faktor podobný inzulínu (IGFBP-1) a TIMP-1 inhibujú apoptózu hepatocytov pri AZP [19]. Angiogenín, vaskulárny endotelový rastový faktor A (VEGF-A) a vaskulárny endoteliálny rastový faktor odvodený od endokrinného systému (EGVEGF) sú zavedené angiogénne promótoxy, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri neovaskularizácii po poškodení pečene [20]. Faktory zahrnuté v DPSC-CM a faktory na opravu endogénneho tkaniva indukované terapeutickou funkciou DPSC-CM v kombinácii zmierňujú AZP.

MSCs sú výnimočné aj ako kandidáti na vhodné imunosupresívum počas transplantácie solídnych tkanív a orgánov ako aj na liečbu reakcie štetu vs. hostiteľ, zápalových ochorení, ako aj iných autoimunitných ochorení. Prvé štúdie ukázali, že DPSCs

významne blokujú proliferáciu stimulovaných T buniek v porovnaní s BMMSCs [21]. DPSCs inhibovali proliferáciu mononukleárných buniek periférnej krvi, ktorá bola stimulovaná mitogénom alebo bola v alogénnej zmiešanej lymfocytovej reakcii, čo naznačuje význam rozpustných faktorov. V predchádzajúcich štúdiách sa preukázalo, že toll-like receptory sú vo všeobecnosti distribuované v bunkách imunitného systému a môžu aktivovať imunosupresiu DPSCs zvýšením expresie TGF- β a IL-6 [22,23]. Najnovšie, Matsumura-Kawashima a kol. podávali DPSC-CM neobéznyim diabetickým myšiam (primárny Sjögrenov syndróm, čo je chronické, systémové autoimunitné ochorenie charakterizované zápalom exokrinných žliaz a funkčným poškodením slinných a slzných žliaz). DPSC-CM vyvinul ochranný účinok na sekrečnú funkciu slinných žliaz. Okrem toho DPSC-CM zlepšila hyposaliváciu znížením expresie zápalových cytokínov, podporou regulačných T buniek v slezine prostredníctvom dráhy TGF- β /Smad, kontrolou lokálneho zápalového mikroprostredia a znížením apoptózy v iných žľazách [24].

Diabetes mellitus je metabolický stav charakterizovaný prevažne chronickou hyperglykémiou, ktorá je spôsobená inzulínovou rezistenciou alebo poruchou sekrécie inzulínu. Celkovo sa u 75 % obéznych pacientov nevyvinie cukrovka v dôsledku účinku kompenzačnej sekrécie inzulínu, ale udržanie funkčných pankreatických β -buniek sa považuje za konečný výsledok liečby cukrovky. Bolo ukázané, že DPSC-CM ovplyvnilo regeneráciu pankreatických β -buniek u streptozotocínom stimulovaných diabetických myší. Izumoto-Akita a kol. poukázali, že za tento proces by mohli byť zodpovedné faktory vylučované z kmeňových buniek [25]. Predchádzajúce štúdie ukázali, že VEGF hrá kľúčovú úlohu v proliferácii a vývoji pankreatických β -buniek a stimulácia fosfoinozítid 3-kinázy potláča bunkovú smrť, proliferáciu a funkciu pankreatických β -buniek [26]. Okrem toho skúmanie frakcionovaného DPSC-CM na základe molekulovej hmotnosti odhalilo, že v porovnaní s DMEM frakcia viac ako 100 kDa zvýšila životaschopnosť buniek MIN6 (myšia pankreatická β -bunková línia) [25]. Taktiež bolo opísané, že DPSCs sa diferencujú na pankreatické β -like bunky, čo naznačuje, že DPSC-CM bežne obsahujú sekretované faktory ovplyvňujúce diferenciačné dráhy, funkciu a sekréciu medzi nervovými bunkami a pankreatickými β -bunkami [27].

Záver

DPSC-CM môže byť relevantný pre bezbunkovú liečbu ochorení súvisiacich s imunitou a zápalom. Napriek tomu sú štúdie hodnotiace imunomodulačné a protizápalové účinky DPSC-CM stále nedostatočné v porovnaní s BMMSC-CM. Ďalšie štúdie by sa mali zamerať na úplné objasnenie kritickej úlohy a súvisiacich mechanizmov imunomodulačných vlastností DPSC-CM. Keďže kondicionované médiá môžu obsahovať aj niekoľko odpadových produktov (výsledok bunkového metabolizmu), existujú limity jeho terapeutického použitia. Okrem toho existuje rozdiel v účinku získaného médiav závislosti od stavu bunkovej kultúry. Pre aplikáciu kondicionovaných médií do klinickej praxe je potrebné zabezpečiť čo najvyššiu uniformitu týchto médií.

PodĎakovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby z operačného programu Integrovaná infraštruktúra, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (ITMS2014+: 313011V358).

Zoznam použitej literatúry

1. Varga, I.; Hollý, D.; Vojtaššák, J.; Böhmer, D.; Polák, Š.; Danišovič, Ľ. Morphological Characterization of in Vitro Expanded Human Dental Pulp-Derived Stem Cells. *Biologia* **2011**, *66*, 706–711.
2. Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.G.; Shi, S. Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) *in Vitro* and *in Vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 13625–13630.
3. Honda, M.; Ohshima, H. Biological Characteristics of Dental Pulp Stem Cells and Their Potential Use in Regenerative Medicine. *Journal of Oral Biosciences* **2022**, *64*, 26–36.
4. Ledesma-Martínez, E.; Mendoza-Núñez, V.M.; Santiago-Osorio, E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells International* **2016**, *2016*, 1–12.
5. Yamada, Y.; Nakamura-Yamada, S.; Umemura-Kubota, E.; Baba, S. Diagnostic Cytokines and Comparative Analysis Secreted from Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells for Functional Cell-Based Therapy. *IJMS* **2019**, *20*, 5900.
6. Bousnaki, M.; Bakopoulou, A.; Pich, A.; Papachristou, E.; Kritis, A.; Koidis, P. Mapping the Secretome of Dental Pulp Stem Cells Under Variable Microenvironmental Conditions. *Stem Cell Rev and Rep* **2022**, *18*, 1372–1407.
7. Ogata, K.; Moriyama, M.; Matsumura-Kawashima, M.; Kawado, T.; Yano, A.; Nakamura, S. The Therapeutic Potential of Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells for Various Diseases. *Biomedicine* **2022**, *10*, 1049.
8. Yamaguchi, S.; Shibata, R.; Yamamoto, N.; Nishikawa, M.; Hibi, H.; Tanigawa, T.; Ueda, M.; Murohara, T.; Yamamoto, A. Dental Pulp-Derived Stem Cell Conditioned Medium Reduces Cardiac Injury Following Ischemia-Reperfusion. *Sci Rep* **2015**, *5*, 16295.
9. Sowa, K.; Nito, C.; Nakajima, M.; Suda, S.; Nishiyama, Y.; Sakamoto, Y.; Nitahara-Kasahara, Y.; Nakamura-Takahashi, A.; Ueda, M.; Kimura, K.; et al. Impact of Dental Pulp Stem Cells Overexpressing Hepatocyte Growth Factor after Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **2018**, *10*, 281–290.
10. Chen, T.-F.; Chen, K.-W.; Chien, Y.; Lai, Y.-H.; Hsieh, S.-T.; Ma, H.-Y.; Wang, K.-C.; Shiau, C.-Y. Dental Pulp Stem Cell-Derived Factors Alleviate Subarachnoid Hemorrhage-Induced Neuroinflammation and Ischemic Neurological Deficits. *IJMS* **2019**, *20*, 3747.
11. Yamamoto, A.; Sakai, K.; Matsubara, K.; Kano, F.; Ueda, M. Multifaceted Neuro-Regenerative Activities of Human Dental Pulp Stem Cells for Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Neuroscience Research* **2014**, *78*, 16–20.
12. Luzuriaga, J.; Polo, Y.; Pastor-Alonso, O.; Pardo-Rodríguez, B.; Larrañaga, A.; Unda, F.; Sarasua, J.-R.; Pineda, J.R.; Ibarretxe, G. Advances and Perspectives in Dental Pulp Stem Cell Based Neuroregeneration Therapies. *IJMS* **2021**, *22*, 3546.
13. Kawabori, M.; Shichinohe, H.; Kuroda, S.; Houkin, K. Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke. *IJMS* **2020**, *21*, 7380.
14. Inoue, T.; Sugiyama, M.; Hattori, H.; Wakita, H.; Wakabayashi, T.; Ueda, M. Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth-Derived Conditioned Medium Enhance Recovery of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Tissue Engineering Part A* **2013**, *19*, 24–29.
15. Chinnici, C.M.; Russelli, G.; Bulati, M.; Miceli, V.; Gallo, A.; Busà, R.; Tinnirello, R.; Conaldi, P.G.; Iannolo, G. Mesenchymal Stromal Cell Secretome in Liver Failure: Perspectives on COVID-19 Infection Treatment. *WJG* **2021**, *27*, 1905–1919.
16. Matsushita, Y.; Ishigami, M.; Matsubara, K.; Kondo, M.; Wakayama, H.; Goto, H.; Ueda, M.; Yamamoto, A. Multifaceted Therapeutic Benefits of Factors Derived from Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth for Acute Liver Failure in Rats: Therapeutic Benefits of Dental Pulp Stem Cells for Acute Liver Failure. *J Tissue Eng Regen Med* **2017**, *11*, 1888–1896.
17. Moumen, A.; Ieraci, A.; Patané, S.; Solé, C.; Comella, J.X.; Dono, R.; Maina, F. Met Signals Hepatocyte Survival by Preventing Fas-Triggered FLIP Degradation in a PI3k-Akt-Dependent Manner. *Hepatology* **2007**, *45*, 1210–1217.

18. Hu, C.; Zhao, L.; Zhang, L.; Bao, Q.; Li, L. Mesenchymal Stem Cell-Based Cell-Free Strategies: Safe and Effective Treatments for Liver Injury. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 377.
19. Duarte, S.; Hamada, T.; Kuriyama, N.; Busuttil, R.W.; Coito, A.J. TIMP-1 Deficiency Leads to Lethal Partial Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury. *Hepatology* **2012**, *56*, 1074–1085.
20. Lin, Y.; Dong, M.; Liu, Z.; Xu, M.; Huang, Z.; Liu, H.; Gao, Y.; Zhou, W. A Strategy of Vascular-targeted Therapy for Liver Fibrosis. *Hepatology* **2022**, *76*, 660–675.
21. Sonoyama, W.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Tuan, R.S.; Wang, S.; Shi, S.; Huang, G.T.-J. Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics* **2008**, *34*, 166–171.
22. Iwasaki, A.; Medzhitov, R. Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses. *Nat Immunol* **2004**, *5*, 987–995.
23. Ji, L.; Bao, L.; Gu, Z.; Zhou, Q.; Liang, Y.; Zheng, Y.; Xu, Y.; Zhang, X.; Feng, X. Comparison of Immunomodulatory Properties of Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Dental Pulp Stem Cells. *Immunol Res* **2019**, *67*, 432–442.
24. Matsumura-Kawashima, M.; Ogata, K.; Moriyama, M.; Murakami, Y.; Kawado, T.; Nakamura, S. Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Improve Sjögren's Syndrome via Regulatory T Cell-Mediated Immunosuppression. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, 182.
25. Izumoto-Akita, T.; Tsunekawa, S.; Yamamoto, A.; Uenishi, E.; Ishikawa, K.; Ogata, H.; Iida, A.; Ikeniwa, M.; Hosokawa, K.; Niwa, Y.; et al. Secreted Factors from Dental Pulp Stem Cells Improve Glucose Intolerance in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Increasing Pancreatic β -Cell Function. *BMJ Open Diab Res Care* **2015**, *3*, e000128.
26. Elghazi, L.; Rachdi, L.; Weiss, A.J.; Cras-Méneur, C.; Bernal-Mizrachi, E. Regulation of β -Cell Mass and Function by the Akt/Protein Kinase B Signalling Pathway. *Diabetes Obes Metab* **2007**, *9*, 147–157.
27. Mäkinen, K.; Manninen, H.; Hedman, M.; Matsi, P.; Mussalo, H.; Alhava, E.; Ylä-Herttuala, S. Increased Vascularity Detected by Digital Subtraction Angiography after VEGF Gene Transfer to Human Lower Limb Artery: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blinded Phase II Study. *Molecular Therapy* **2002**, *6*, 127–133.

Zdravotný aspekt rómskej populácie na Slovensku

Petra LUKÁČIKOVÁ

Anatomický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava

Súhrn

Zdravie rómskeho obyvateľstva je často diskutovanou a značne komplikovanou témou. Celková situácia ohľadom zdravotného stavu tejto menšiny na Slovensku nie je priaznivá. Vyplýva to z mnohých faktorov, ako sú napríklad spôsob života, zdravotná „negramotnosť“ a nízky hygienický štandard. Najhoršia situácia je v segregovaných rómskych osadách východného Slovenska.

Kľúčové slová: menšina, choroby, zdravotná starostlivosť

Health aspect of the Roma population in Slovakia

Summary

The health of the Roma population is an often discussed and highly complicated topic. The overall situation regarding the health status of this minority in Slovakia is not favorable. This results from many factors, such as lifestyle, health "illiteracy" and low hygiene standards. The worst situation is in the segregated Roma settlements of eastern Slovakia.

Keywords: minority, diseases, health care

Úvod a problematika

Rómska populácia (etnikum indického pôvodu), je už takmer sedem storočí súčasťou obyvateľstva územia dnešnej Slovenskej republiky (Šprocha 2014; Šuvada 2015).

Celkový počet Rómov vo svete sa odhaduje približne na 20 až 60 miliónov, pričom v rámci krajín EÚ predstavujú najpočetnejšiu etnickú skupinu (10 až 12 miliónov). Najvyšší počet Rómov pripadá na Turecko a Rumunsko, avšak najvyššie percentuálne zastúpenie voči majoritnej populácii krajiny sa odhaduje v Bulharsku, Macedónsku a tiež na Slovensku. Na Slovensku teda máme, vzhľadom na počet obyvateľov, jednu z najpočetnejších rómskych komunít na svete; odhadom vyše 400 až 430 tisíc Rómov (Vaňo, Mészáros 2004; Michaeli a Dravecká 2012; Mušínska et al 2014; Hubková et al 2014).

Demograficky je rómska populácia progresívna (na základe vekovej štruktúry a počtu narodených detí); vyznačuje sa veľmi mladou vekovou štruktúrou. Dlhodobá zlá socio-ekonomická situácia, nízka vzdelanosť a životný štýl Rómov korelujú so zlým zdravotným statusom tohto obyvateľstva (FSG 2007; Michaeli a Dravecká 2012; Šprocha 2014; Šupínová et al 2015).

Špecifická situácia v rámci rómskej populácie vyplýva z jej etnického pôvodu, zvykov a tradícií. Rómovia sa odlišujú spôsobom života, sociálno-triednou štruktúrou; odlišujú sa i z antropologického hľadiska. K tejto situácii prispieva i určitý stupeň izolácie voči nerómskej majoritnej populácii. Rómska populácia teda predstavuje sociálne slabé obyvateľstvo, s nízkou životnou úrovňou a celkovo horším zdravotným stavom. Toto etnikum sa dodnes plne neprispôbilo trvalému bývaniu na určitej úrovni a taktiež občianskej spoločnosti. Neúspešná integrácia Rómov predstavuje nie len slovenský ale aj celoeurópsky

problém (Michaeli a Dravecká 2012; Šprocha 2014; Rusnáková a Rochovská 2014 a 2016; Šuvada 2015).

Atlas rómskych komunít z rokov 2004/2013/2019 podáva azda najkomplexnejšie informácie o životných podmienkach tejto menšiny na Slovensku, avšak charakteru pramenných údajov (kvalifikovaných odhadov). Čo sa týka geografického rozmiestnenia celkovo najvyššie zastúpenie Rómov má Východoslovenský región. Čo sa týka verejných služieb (najmä zdravotnej starostlivosti), všeobecne, ich dostupnosť v sledovaných obciach nebola a stále nie je priaznivá (chýbajúce ambulancie všeobecných lekárov, pediatrov, stomatológov a gynekológov). Problémom sú i chýbajúce hygienické centrá a lekárne. Aj napriek vcelku priaznivej situácii ohľadom dostupnosti inžinierskych sietí na Slovensku, mnohé rómske rodiny žijú v obytných jednotkách nespĺňajúcich základné požiadavky zdravia a hygieny. Jedná sa najmä o marginalizované / segregované rómske osady (Michaeli a Dravecká 2012; Mušinka et al 2014).

Tak, ako nie sú známe dostatočne presné údaje o štruktúre rómskeho obyvateľstva (len výsledky štúdií a prieskumov), tak nemáme k dispozícii ani komplexné relevantné a aktuálne údaje o jeho zdravotnom stave (natalita/mortalita, chorobnosť Rómov). Zväčša sa realizujú len parciálne regionálne prieskumy (čiastkové informácie z terénnych výskumov mikropopulácií z osád) (Šprocha 2014; Šupínová et al 2015).

Čo sa týka zdravotného stavu rómskej populácie, okrem vyššie uvedených faktov, výrazným problémom je aj to, že zdravie sa pre Rómov stáva prioritou až pri viditeľných príznakoch choroby/zdravotného problému (pričom často býva dôvodom strach z vyšetrenia); lekára zväčša vyhľadávajú len v akútnych prípadoch. Rómovia využívajú zdravotné služby celkovo zhruba o jednu tretinu menej než majoritná populácia Slovenska. Nápomocným by v tomto smere mohol byť program zdravotných asistentov (často Rómov samotných), pracujúcich v teréne a poskytujúcich základnú zdravotnú starostlivosť, prevenciu i osvetu (FSG 2007; Bojko et al 2018).

Výsledky doterajších parciálnych štúdií a prieskumov v rámci celého územia Slovenska poukazujú na horší zdravotný status rómskej populácie, v porovnaní s majoritným obyvateľstvom. Jedná sa najmä o reprodukčné zdravie, infekčné ochorenia, akútne i chronické ochorenia. Zvýšená chorobnosť rómskej populácie sa teda týka infekčných aj neinfekčných ochorení. Z infekčných ochorení sa u Rómov často vyskytuje vírusová hepatitída typu A, bacilárna dyzentéria, tuberkulóza a salmonelóza; pľúcne, hnačkové a pohlavné ochorenia sú taktiež celkovo časté. Početné sú i zápaly, výskyt svrabu a vší. Medzi pomerne časté zdravotné problémy Rómov patrí i obezita asociovaná s kardiovaskulárnymi chorobami (vysoko energetická diéta a nižšia fyzická aktivita) (Paraličová et al 2015; Šupínová et al 2015).

Ako uvádza Macejová et al (2020), u východoslovenských Rómov bola zistená vyššia incidencia metabolického syndrómu, ochorení obličiek, vírusovej hepatitídy B a E a tiež parazitárnych ochorení (*Toxoplasma gondii*, *Toxocara* spp.).

V rámci reprodukčného zdravia je otázka plodnosti Rómov jednou z najdiskutovanejších tém. U Rómov sa vyskytuje veľmi veľa mladých matiek (mladších ako 18 rokov), taktiež častá je multiparita (4 až 5 detí na jednu ženu), a tiež vysoký koeficient inbrídingu a z neho prameniace genetické ochorenia. Miera plodnosti je u Rómov vyššia vo všetkých vekových kategóriách, v porovnaní s majoritnou populáciou Slovenska. Vysoká je však i úroveň spontánnej potratovosti a dojčenskej mortality. V rómskej spoločnosti sú 12- až 14-ročné dievčatá tradične považované za dospelé; antikoncepcia a debata o pohlavnom živote býva často tabu a považovaná za „zlú“. Umelé prerušenie tehotenstva využívajú najmä

viacnásobné rómske matky (ako antikoncepciu ex-post) (FSG 2007; Šprocha 2014; Šupínová et al 2015; Bojko et al 2018).

Stredná dĺžka života rómskych mužov a žien je zhruba o šesť až deväť rokov kratšia než u majoritnej populácie. Niektorí autori udávajú ešte väčší rozdiel. Rozdiely v dĺžke života a dožičenskej úmrtnosti sú i v rámci jednotlivých okresov Slovenska, kde najhoršia situácia je opäť na Východnom Slovensku (dosahuje úroveň rozvojových krajín) (Šprocha 2014; Šupínová et al 2015; Bojko 2018). Ako uvádza Šprocha (2014), v rámci problematiky mortality existuje predpoklad výrazne kratšej dĺžky života Rómov (o 15 až 20 rokov), v porovnaní s majoritnou populáciou. Presné, relevantné údaje však chýbajú; ako už bolo uvedené vyššie, k dispozícii sú len obmedzené, nedostatočné informácie. Stredná dĺžka života sa považuje za základný ukazovateľ zdravotného stavu populácie. ústnej dutiny, ktoré tvoria zuby, ďasná a jazyk, je jedným z najšpecializovane.

Záver

Ako uvádzajú mnohé štúdie (FSG 2007; Michaeli a Dravecká 2012; Šprocha 2014; Rusnáková a Rochovská 2014 a 2016; Šupínová et al 2015; Šuvada 2015; Paraličová et al 2015; Bojko et al 2018), zdravotný stav rómskeho etnika na Slovensku je celkovo horší, v porovnaní s majoritnou populáciou. Tento nepriaznivý stav je dôsledkom mnohých exo- i endogénnych faktorov, ako: horšia dostupnosť zdravotnej starostlivosti, obmedzený prístup k základnej infraštruktúre, nedostatočná hygiena Rómov, ich zlý socio-ekonomický status, užívanie návykových látok (už v mladom veku, či tehotenstve), zlé stravovacie návyky, nízka vzdelanosť, nízky štandard bývania a ekologická rizikovosť prostredia; ďalšími faktormi sú rómska kultúra a životný štýl, nedostatočná odborná a zdravotná spôsobilosť, no a v neposlednom rade tiež neochota Rómov spolupracovať, ich nízka motivácia, uvedomelosť, hygienické a pracovné návyky a prístup k zdravotnej prevencii. Prognóza do budúcnosti hovorí o zvyšovaní počtu tohto obyvateľstva a tak je problematika zdravotného aspektu rómskej populácie dôležitým bodom. Dobrý zdravotný stav obyvateľov Slovenska, vrátane menších, predstavuje významný ukazovateľ rozvoja krajiny.

Zoznam použitej literatúry

1. Bojko M., Hidas S., Machlica G., Smatana M.: Inklúzia Rómov je potrebná aj v zdravotníctve, Pohľad na výsledkové indikátory zdravia Rómov cez administratívne dáta, 2018, online: https://www.mfsr.sk/files/archiv/34/2018_23_Inkluzia_zdravie_final.pdf
2. FSG (2007): Zdravotná starostlivosť v sociálne vylúčených rómskych komunitách. Fundaci3n Secretariado Gitano, Madrid, online: http://ec.europa.eu/health/ph_projects/2004/action3/docs/2004_3_01_manuals_sk.pdf
3. Hubkova, B., Tkáčiková S., Guzy J., Mareková M., HEPA-META team: Health of Roma in eastern Slovakia. Individual and Society, 2014, Vol. 17, No. 1., 98-102.
4. Macejova Z., Kristian P., Janicko M., Halanova M., Drazilova S., Antolova D., Marekova M., Pella D., Madarasova-Geckova A., Jarcuska P., HEPAMETA TEAM: The Roma Population Living in Segregated Settlements in Eastern Slovakia Has a Higher Prevalence of Metabolic Syndrome, Kidney Disease, Viral Hepatitis B and E, and Some Parasitic Diseases Compared to the Majority Population, Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(9): 3112.
5. Michaeli E., Dravecka B.: Vybrané aspekty štruktúry rómskych osídlení v okresoch prešovského samosprávneho kraja, Folia geographica 19, 2012, vol. LIV, 184-195 str.,
6. ISSN 1336-6157.
7. Muřinka A., Škobla D., Hurre J., Matlovičová K., Kling J.: Atlas rómskych komunit na Slovensku 2013. Bratislava, UNDP, 2014. ISBN 978-80-89263-18-9, 120 strán.

8. Parličková Z., Jarčuška P., Hudáčková D.: Infekčné choroby u marginalizovaných skupín Rómov žijúcich v osadách. In *Via Pract*, 2015, 12(3): 111–113 ISSN 1336-4790.
9. Rusnáková J., Rochovská A.: Segregácia obyvateľov marginalizovaných rómskych komunít, chudoba a znevýhodnenia súvisiace s priestorovým vylúčením. *GEOGRAPHIA CASSOVIENSIS* VIII 2/2014, online: http://www.humannageografia.sk/clanky/Rusnakova_Rochovska_tlac1.pdf
10. Rusnáková J., Rochovská A.: Sociálne vylúčenie, segregácia a životné stratégie obyvateľov rómskych komunít z pohľadu teórie zdrojov, *Geografický časopis/Geographical Journal*, 2016, 68 (3), 245-260.
11. Šprocha B.: Reprodukcia rómskeho obyvateľstva na Slovensku a prognóza jeho populačného vývoja. Prognostický ústav Slovenskej akadémie vied, OF PRINT JH, 2014, 177 strán, ISBN 978-80-89037-38-4.
12. Šupínová M., Hegyi L., Klement C.: Zdravotný stav Rómov na Slovensku, *Hygiena*, 2015, 60(3), 116-119.
13. Šuvada M.: Rómovia v slovenských mestách. Bratislava: POMS, 2015, 168 strán, ISBN 978-80-8061-828-5.
14. Vaňo B., Meszaros J.: Reprodukčné správanie obyvateľstva v obciach s nízkym životným štandardom, *INFOSTAT – Inštitút informatiky a štatistiky, Výskumné demografické centrum*, 2004, 32 strán, online: <http://www.infostat.sk/vdc/pdf/nizkyzs.pdf>

Somatické kmeňové bunky získané z tukového väziva ako zdroj bioaktívnych molekúl a ich využitie v terapii vybraných patologických stavov

Martin BOHÁČ, Dana IVANIŠOVÁ

Regenmed spol. s r. o., Medená 29, 811 02 Bratislava

Súhrn

Kmeňové bunky získané z tukového tkaniva (ADSCs) sa stali jednými z najvyužívanejších dospelých kmeňových buniek kvôli ich množstvu a relatívne ľahkej a bezpečnej dostupnosti. Nedávne štúdie ukázali, že parakrinné cytokíny, exozómy a ďalšie aktívne látky sú hlavnými faktormi, prostredníctvom ktorých ADSCs uplatňujú svoje biologické účinky. Deriváty ADSCs si v poslednej dobe získavajú pozornosť ako potenciálne terapeutické prostriedky pre rôzne ľudské choroby. Tieto deriváty zahŕňajú ADSC-kondicionované médiá, exozómy a extrakty z ADSCs. V súčasnosti rastie záujem o tieto deriváty a v posledných rokoch stali stredobodom výskumu v oblasti regeneratívnej medicíny. Tento článok sumarizuje účinky ADSCs derivátov vo vyššie uvedenom kontexte.

Kľúčové slová: ADSCs, kondicionované médiá, sekretóm, exozómy, regenerácia

Somatic stem cells obtained from adipose tissue as a source of bioactive molecules and their use in the therapy of selected pathological conditions

Summary

Adipose-derived stem cells (ADSCs) have become one of the most widely used adult stem cells due to their abundance and relatively easy and safe availability. Recent studies have shown that paracrine cytokines, exosomes and other active substances are the main factors through which ADSCs exert their biological effects. Derivatives of ADSCs have recently gained attention as potential therapeutic agents for various human diseases. These derivatives include ADSC-conditioned media, exosomes, and extracts from ADSCs. Interest in these derivatives is currently growing, and in recent years they have become the focus of research in the field of regenerative medicine. This article summarizes the effects of ADSCs derivatives in the above-mentioned context.

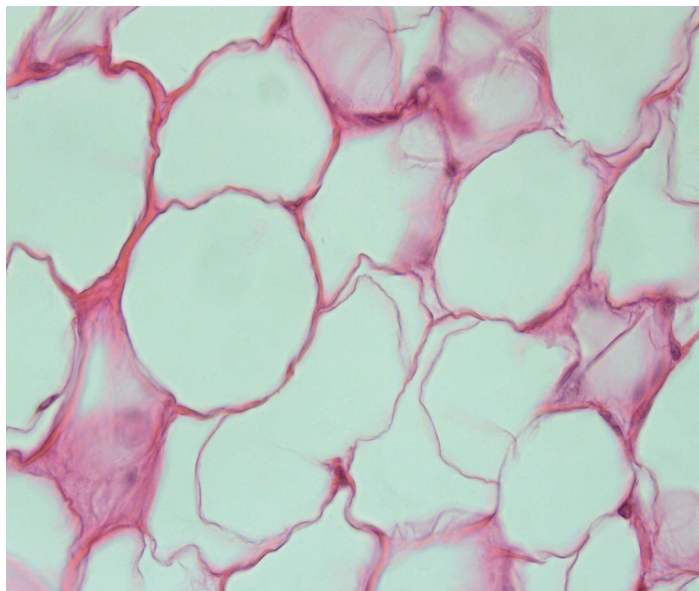
Keywords: ADSCs, conditioned media, secretome, exosomes, regeneration

Úvod

Tukové väzivo (Obr. 1) pozostáva zo stromálnej vaskulárnej frakcie (SVF), zrelých adipocytov a extracelulárnej matrix (ECM). SVF zahŕňa kmeňové bunky odvodené z tukového väziva (ADSCs), tukové prekursorové bunky, endotelové bunky a makrofágy. Autotransplantácia tuku môže nahradiť mäkké tkanivá a ADSCs prítomné v tukovom tkanive zohrávajú regeneračnú úlohu – podporujú migráciu, proliferáciu a sekrečnú aktivitu rezidentských buniek. Okrem toho tukové väzivo moduluje endokrinný systém prostredníctvom rôznych bioaktívnych molekúl, ako je napr. adiponektín a leptín [1,2].

V roku 2005 Medzinárodná spoločnosť pre bunkovú terapiu definovala mezenchymálne kmeňové bunky ako triedu buniek s plasticitou a trjlíniovým diferenciačným

potenciálom. Okrem toho exprimujú špecifické povrchové antigény ako CD73, CD90 a CD105 a zároveň sú negatívne na markery krvotvorných a endotelových buniek [3]. Tieto bunky majú nízku etickú záťaž pri aplikácii a majú protizápalové, imunomodulačné a vysoké regeneračné vlastnosti. Mezenchymálne kmeňové bunky preto vykazujú veľký potenciál v liečbe mnohých ochorení, vrátane imunitných a neimunitných ochorení [4].



Obr. 1. Histologický snímok tukového väziva.

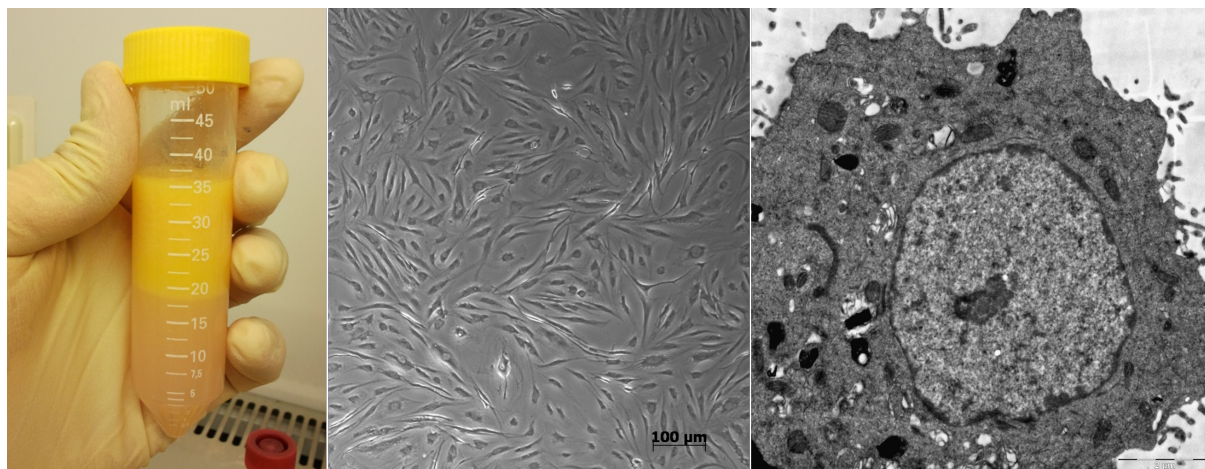
ADSC sú typom MSCs odvodeným z tukových tkanív a majú potenciál pre samoobnovu a viaclíniovú diferenciáciu, ako aj schopnosť vylučovať veľké množstvo bioktívnych molekúl. ADSCs sú považované za jeden z najslubnejších typov dospelých kmeňových buniek na klinické použitie a sú široko používané na výskum tkanivového inžinierstva a regeneratívnej medicíny [5]. Významné je, že ADSC-kondicionované médium (ADSC-CM) a ADSC exozómy (ADSC-Exo) si nedávno získali pozornosť ako alternatívne prístupy ku konvenčnej bunkovej terapii.

Deriváty ADSCs zahŕňajú ADSC-CM, ADSC-Exo a extrakty z ADSCs (ATEs). ADSC-CM – ktoré obsahuje aktívne látky vylučované ADSCs, ako sú cytokíny, exovezikuly, exozómy, DNA a RNA – môže podporovať opravu tkaniva a regulovať imunitu [6]. ADSC-Exo sú extracelulárne vezikuly, ktoré nesú proteíny, RNA, DNA a lipidové molekuly a môžu prenikať cez tkanivové bariéry a podieľať sa na výmene materiálov a informácií medzi bunkami [7]. Keďže deriváty ADSCs neobsahujú bunky, a teda nemôžu aktívne prispievať k vyvolaniu imunitnej odpovede a tumorigenéze, možno ich použiť na alogénnu transplantáciu. Tieto deriváty sa ľahko transportujú a skladujú, majú široký terapeutický potenciál na liečbu rôznych patologických stavov.

Kmeňové bunky získané z tukového tkaniva

ADSCs (obr. 2) sú mezenchymálne kmeňové bunky, ktoré sa získavajú z tukového väziva na princípe adherovania na dno plastových kultivačných fliaš. Ďalej sú charakterizované vysokou proliferačnou aktivitou (môžu byť expandované *in vitro*) a majú schopnosť diferencovať sa do viacerých bunkových línii. Po morfologickej stránke sú podobné fibroblastom. Exprimujú povrchové antigény typické pre MSCs – CD73, CD90 a CD

105. Naopak vykazujú negatívnosť na markery krvotvorných a endotelových buniek. Veľmi významné sú aj ich imunomodulačné vlastnosti [2,8].



Obr. 2. Zdroj ADSCs – tukové väzivo. Morfológia ADSCs na úrovni svetelnej mikroskopie a TEM.

Deriváty ADSCs a ich využitie v regeneratívnej medicíne

Hoci MSCs dosahujú sľubné výsledky v obnove poškodených tkanív, ich využitie v regeneratívnej medicíne má svoje limity. Limitujúcimi faktormi sú najmä nízka miera prežitia buniek po transplantácii, imunologická odpoveď organizmu, či ich znížený diferenciálny potenciál. Hoci mezenchymálne kmeňové bunky dosahujú sľubné výsledky v obnove poškodených tkanív, ich využitie v regeneratívnej medicíne má svoje limity. Limitujúcimi faktormi sú najmä nízka miera prežitia buniek po transplantácii, imunologická odpoveď organizmu, či ich znížený diferenciálny potenciál. Preto vznikla potreba preskúmať alternatívne prístupy k bunkovej terapii, akým je využitie médií kondicionovaných mezenchymálnymi kmeňovými bunkami [9].

Mnoho štúdií potvrdilo, že mechanizmus účinku MSC na obnovu tkanív nespočíva len v ich schopnosti nahradiť poškodené bunky a diferenciálnym potenciálom, ale najmä v ich parakrinnom pôsobení [10]. MSCs do svojho okolia sekrutujú rastové faktory, cytokíny, chemokíny, zložky ECM a extracelulárne vezikuly (EV) [11]. Jednou zo subpopulácií EV o veľkosti 30-150 nm tvoria exozómy [12]. Ich obal je tvorený lipidovou dvojvrstvou a sú produkované rôznymi typmi buniek [13]. V minulosti boli tieto EV považované pôvodne za bunkový odpad vznikajúci v dôsledku poškodenia buniek alebo za vedľajšie produkty homeostázy, ktoré nemajú významný vplyv na susedné bunky [14]. V posledných rokoch sa však dokázalo, že sú dôležité pre medzibunkovú komunikáciu a signalizáciu [15]. Sú prenášačmi proteínov, lipidov, DNA, mRNA, microRNA, LncRNA, cytokínov a transkripčných faktorov [16,17]. Molekulárny obsah exozómov kopíruje zloženie ich materskej bunky [18]. Keď sa exozómy dostanú k cieľovej bunke, môžu spustiť signalizáciu buď priamou interakciou s extracelulárnymi receptormi, pohltením bunkou a splynutím s plazmatickou membránou, alebo sa internalizáciou [15].

Vďaka exozómom a bioaktívnym molekulám produkovaným MSC predstavuje MSC-CM kompletné regeneračné prostredie [19]. Kmeňové bunky derivované z tuku (ADSC) sa stali vďaka ich množstvu a pomerne ľahkej dostupnosti jednými z najvyužívanejších zdrojov adultných kmeňových buniek. Neustále pribúdajúce štúdie opätovne dokazujú, že parakrinné

cytokíny, exozómy a iné bioaktívne molekuly predstavujú hlavné faktory, prostredníctvom ktorých ADSC sprostredkovávajú svoje biologické funkcie.

Cytokínový profil medií kondicionovaných ADSCs (ADSC-CM) varíruje v závislosti od ich kultivačných podmienok. ADSC-CM získané kultiváciou buniek za hypoxických podmienok (2% O₂) je na cytokíny bohatšie v porovnaní s normoxiou [20]. Obsah cytokínov v CM závisí aj od priestorového usporiadania buniek. 3D kultúry stimulujú tvorbu väčšieho množstva cytokínov v porovnaní s 2D monovrstvovou bunkovou kultúrou [21] a preto kombinácia hypoxie a 3D kultúr by mohla predstavovať vhodné kultivačné podmienky pre získanie ADSC-CM.

ADSC-CM majú pre potreby regeneratívnej medicíny a tkanivového inžinierstva rôzne využitie. Stessul et al. [22] skúmali vplyv ADSC-CM v kombinácii s plazmou bohatou na krvné doštičky (PRP) na proliferáciu a migráciu fibroblastov a keratinocytov v *in vitro* podmienkach. Vďaka výsledkom, ktoré ukázali výrazný nárast proliferácie a podporu migrácie po 48 h, možno tvrdiť, že ADSC-CM majú terapeutický potenciál pre hojenie a reepitelizáciu chronických rán *in vivo*. V ďalšej štúdii sa Kim et al. [23] venovali porovnávaníu ADSC-CM získaných z 3D (ADSC-CM-3D) a 2D (ADSC-CM-2D) kultúr. Proteomická analýza ADSC-CM odhalila, že kolagény a aktíny boli v ADSC-CM-3D vysoko exprimované. Chitináza 3-like protein 1 (CHI3L1), tkanivový inhibitor metaloproteináz (TIMP) a galektín-1 boli špecificky exprimované len v ADSC-CM-3D. Najmä neutralizáciou protilátky sa zistilo, že galektín-1 v ADSC-CM-3D je dôležitým faktorom pre migráciu ľudských keratinocytov. Tieto výsledky preto naznačujú, že ADSC-CM-3D by bolo pri hojení rán účinnejšie v porovnaní s ADSC-CM-2D. Výsledky štúdie, ktorú priniesol Lee et al., dokázali, že ADSC-CM získaného kultiváciou buniek v hypoxických podmienkach (hypoCM), výraznejšie stimulovali syntézu kolagénu a migráciu ľudských dermálnych fibroblastov v porovnaní s ADSC-CM získaných v podmienkach normoxie (norCM). Okrem toho analýza mRNA a proteínov ukázali, že hypoxia zvyšuje reguláciu rastových faktorov, ako je vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF) a základný fibroblastový rastový faktor (bFGF). Sľubným terapeutickým prostriedkom na obnovu a hojenie rán sú taktiež exozómy derivované z ADSCs (ADSC-Exo). ADSC-EXO modulujú imunitné reakcie a zápal, podporujú angiogénu, urýchľujú proliferáciu a reepitelizáciu kožných buniek a regulujú remodeláciu kolagénu, ktorá inhibuje hyperpláziu jaziev. ADSC-EXO taktiež podporujú hojenie rán u diabetických pacientov [25].

Štúdia Lee et al. [26] naznačuje, že ADSC-EXO zohrávajú kľúčovú úlohu pri neuroprotekcii a neuroregenerácii a môžu byť využité na liečbu neurodegeneratívnych porúch. Ukázalo sa totiž, že liečba prostredníctvom ADSC-EXOS znižuje hladiny amyloidu beta (A β) a pomer A β 42/40, ktorý spôsobuje mitochondriálnu dysfunkciu neurónov v transgénnych myšiach s Alzheimerovou chorobou, čím sa zvýši prežívanie buniek a zníži odumieranie neurónov v hipokampe a mozgovej kôre. V ďalšom experimente dokázali ADSC-EXO znížiť akumuláciu agregátov mHtt, apoptózu buniek a mitochondriálnu dysfunkciu aktiváciou dráhy p-CREB-PGC1 α , čo prináša nádej pre pacientov s Huntingtonovou chorobou [27]. Dôležitou súčasťou sekretómu ADSC je aj lncRNA MALAT1, ktorá reguluje expresiu iných nekódujúcich RNA vrátane snoRNA. Po podaní ADSC-EXO potkanom s traumatickým poranením mozgu bola pozorovaná výrazná obnova motorických funkcií a zároveň došlo k zníženiu poškodenia mozgovej kôry. Dokázalo sa teda, že MALAT1 v ADSC-EXO moduluje zápal a iné terapeutické ciele a má obrovský potenciál v liečbe traumatických poranení mozgu [28].

ADSCs sekretujú väčšie množstvo Angpt1, LIF, TGF- β 1 a rovnaké množstvá VEGF-A a HGF v porovnaní s kmeňovými bunkami izolovanými z kostnej drene (BMSC), a preto

sú vhodnejším kandidátom na liečbu kardiovaskulárnych ochorení [29]. Rehman et al. [30] vo svojom výskume sledovali efekt HypoCM na angiogénu a antiapoptický potenciál *in vitro*. Ukázalo sa, že v prípade HypoCM došlo k výraznému nárastu počtu endotelových buniek oproti bunkám kultivovaných v nekondicionovanom bazálnom médiu. Zároveň bol zaznamenaný aj výrazný pokles apoptózy endotelových buniek kultivovaných v HypoCM. ADSC-EXO môžu nájsť svoje využitie v liečbe ischemickej cievnej mozgovej príhody [31,32]. V štúdiu vedenej Chen et al. [32] sa ukázalo, že ADSC-EXO dokážu podporiť regeneráciu neurónov a zmenšiť ložisko infarktu po ischemickej cievnej mozgovej príhode u laboratórnych potkanov. Po treťom dni od mozgovej príhody dokázala podaná dávka ADSC-EXO znížiť edém mozgu.

Mitchel et al. sa vo svojom výskume zamerali na schopnosť sekretómu ADSC podporiť tri základné znaky regenerácie tkanív a to proliferáciu, diferenciáciu a migráciu buniek. Ukázalo sa, že po 48h kultivácie v médiu obsahujúcom sekretóm ADSC došlo k výraznému nárastu počtu myších myoblastov C2C12. Navyše, sekretóm dokázal stimulovať diferenciáciu buniek C2C12 smerom k myotubom. Avšak zmena v migrácii buniek nebola štatisticky významná v porovnaní s kontrolou [33]. ADSC-EXO majú taktiež schopnosť podnecovať MSC k osteogénnej diferenciácii [34]. V štúdiu Zhao et al. [35] skúmali imunomodulačné vlastnosti ADSC-EXO. Ukázalo sa, že pri kokultivácii spolu s aktivovanými synoviálnymi fibroblastmi došlo k zníženiu exprese prozápalových markerov IL-6, NF- κ B a TNF- α a na druhú stranu došlo k zvýšeniu exprese protizápalového cytokínu IL-10. Navyše ADSC-EXO dokázali ochrániť chondrocyty pred H₂O₂ navodenou apoptózou, podporili chondrogenézu periostálnych buniek a expresiu chondrogénnych markerov vrátane kolagénu typu II a β -katenínu. Periostálne bunky ošetrované exozómami vykazovali vyššie hladiny miR-145 a miR-221. Štúdia tak poskytla dôkazy na podporu využitia patientskych ADSC-EXO pri liečbe osteoartrózy.

Záver

Použitie ADSCs derivátov prekonáva obmedzenia klinických aplikácií ADSCs a vykazuje množstvo výhod. Tieto deriváty sa ľahko sa prenášajú, prepravujú a skladujú; vykazujú nízku imunogenicitu a žiadnu potenciálnu tumorigenicitu a môžu sa teda použiť na alogénnu transplantáciu. Lokálna aplikácia môže podporovať bunkovú proliferáciu, migráciu a angiogénu, potlačiť apoptózu buniek a zápal a znižuje oxidačný stres a reguláciu imunity. Preto majú široké vyhliadky na klinické použitie.

PodĎakovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby z operačného programu Integrovaná infraštruktúra, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (ITMS2014+: 313011V358).

Zoznam použitej literatúry

1. Poulos, S.P.; Hausman, D.B.; Hausman, G.J. The Development and Endocrine Functions of Adipose Tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2010**, *323*, 20–34.
2. Karastergiou, K.; Mohamed-Ali, V. The Autocrine and Paracrine Roles of Adipokines. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2010**, *318*, 69–78.
3. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317.

4. Squillaro, T.; Peluso, G.; Galderisi, U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* **2016**, *25*, 829–848.
5. Zarei F, Abbaszadeh A. Stem cell and skin rejuvenation. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. **2018** Apr 3;20(3):193–7.
6. L. PK, Kandoi S, Misra R, S. V, K. R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **2019** Apr;46:1–9.
7. Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *Journal of Clinical Investigation*. **2016** Apr 1;126(4):1152–62.
8. Zuk, P.A.; Zhi, M.; Mizuno, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. **2001**, *7*, 211–28.
9. Jayaraman, P.; Nathan, P.; Vasanthan, P.; Musa, S.; Govindasamy, V. Stem Cells Conditioned Medium: A New Approach to Skin Wound Healing Management. *Cell Biology International* **2013**, *37*, 1122–1128, doi:10.1002/cbin.10138.
10. Gunawardena, T.N.A.; Rahman, M.T.; Abdullah, B.J.J.; Abu Kasim, N.H. Conditioned Media Derived from Mesenchymal Stem Cell Cultures: The next Generation for Regenerative Medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2019**, *13*, 569–586, doi:10.1002/term.2806.
11. Jayaraman, P.; Nathan, P.; Vasanthan, P.; Musa, S.; Govindasamy, V. Stem Cells Conditioned Medium: A New Approach to Skin Wound Healing Management. *Cell Biology International* **2013**, *37*, 1122–1128, doi:10.1002/cbin.10138.
12. Xi, J.; Yan, X.; Zhou, J.; Yue, W.; Pei, X. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repairing and Regeneration: Progress and Future. *Burns Trauma* **2015**, *1*, 13–20, doi:10.4103/2321-3868.113330.
13. Han, Y.; Yang, J.; Fang, J.; Zhou, Y.; Candi, E.; Wang, J.; Hua, D.; Shao, C.; Shi, Y. The Secretion Profile of Mesenchymal Stem Cells and Potential Applications in Treating Human Diseases. *Sig Transduct Target Ther* **2022**, *7*, 1–19, doi:10.1038/s41392-022-00932-0.
14. Nikfarjam, S.; Rezaie, J.; Zolbanin, N.M.; Jafari, R. Mesenchymal Stem Cell Derived-Exosomes: A Modern Approach in Translational Medicine. *Journal of Translational Medicine* **2020**, *18*, 449, doi:10.1186/s12967-020-02622-3.
15. Tenchov, R.; Sasso, J.M.; Wang, X.; Liaw, W.-S.; Chen, C.-A.; Zhou, Q.A. Exosomes—Nature’s Lipid Nanoparticles, a Rising Star in Drug Delivery and Diagnostics. *ACS Nano* **2022**, *16*, 17802–17846, doi:10.1021/acsnano.2c08774.
16. Zhang, Y.; Liu, Y.; Liu, H.; Tang, W.H. Exosomes: Biogenesis, Biologic Function and Clinical Potential. *Cell & Bioscience* **2019**, *9*, 19, doi:10.1186/s13578-019-0282-2.
17. Gurung, S.; Perocheau, D.; Touramanidou, L.; Baruteau, J. The Exosome Journey: From Biogenesis to Uptake and Intracellular Signalling. *Cell Communication and Signaling* **2021**, *19*, 47, doi:10.1186/s12964-021-00730-1.
18. Rech, J.; Getinger-Panek, A.; Galka, S.; Bednarek, I. Origin and Composition of Exosomes as Crucial Factors in Designing Drug Delivery Systems. *Applied Sciences* **2022**, *12*, 12259, doi:10.3390/app122312259.
19. Wang, X.; Tian, L.; Lu, J.; Ng, I.O.-L. Exosomes and Cancer - Diagnostic and Prognostic Biomarkers and Therapeutic Vehicle. *Oncogenesis* **2022**, *11*, 1–12, doi:10.1038/s41389-022-00431-5.
20. Vizoso, F.J.; Eiro, N.; Cid, S.; Schneider, J.; Perez-Fernandez, R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, 1852, doi:10.3390/ijms18091852.
21. Cai, Y.; Li, J.; Jia, C.; He, Y.; Deng, C. Therapeutic Applications of Adipose Cell-Free Derivatives: A Review. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 312, doi:10.1186/s13287-020-01831-3.

22. Ylostalo, J.H.; Bartosh, T.J.; Tiblow, A.; Prockop, D.J. Unique Characteristics of Human Mesenchymal Stem/Progenitor Cells (MSC) Pre-Activated in 3D Cultures under Different Conditions. *Cytotherapy* **2014**, *16*, 1486–1500, doi:10.1016/j.jcyt.2014.07.010.
23. Stessuk, T.; Puzzi, M.B.; Chaim, E.A.; Alves, P.C.M.; de Paula, E.V.; Forte, A.; Izumizawa, J.M.; Oliveira, C.C.; Frei, F.; Ribeiro-Paes, J.T. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Stimulatory Effects on Proliferation and Migration of Fibroblasts and Keratinocytes in Vitro. *Arch Dermatol Res* **2016**, *308*, 511–520, doi:10.1007/s00403-016-1676-1.
24. Kim, M.H.; Wu, W.H.; Choi, J.H.; Kim, J.; Jun, J.H.; Ko, Y.; Lee, J.H. Galectin-1 from Conditioned Medium of Three-Dimensional Culture of Adipose-Derived Stem Cells Accelerates Migration and Proliferation of Human Keratinocytes and Fibroblasts. *Wound Repair Regen* **2018**, *26 Suppl 1*, S9–S18, doi:10.1111/wrr.12579.
25. An, Y.; Lin, S.; Tan, X.; Zhu, S.; Nie, F.; Zhen, Y.; Gu, L.; Zhang, C.; Wang, B.; Wei, W.; et al. Exosomes from Adipose-derived Stem Cells and Application to Skin Wound Healing. *Cell Prolif* **2021**, *54*, e12993, doi:10.1111/cpr.12993.
26. Lee, M.; Ban, J.-J.; Yang, S.; Im, W.; Kim, M. The Exosome of Adipose-Derived Stem Cells Reduces β -Amyloid Pathology and Apoptosis of Neuronal Cells Derived from the Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Res* **2018**, *1691*, 87–93, doi:10.1016/j.brainres.2018.03.034.
27. Lee, M.; Liu, T.; Im, W.; Kim, M. Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells Ameliorate Phenotype of Huntington's Disease in Vitro Model. *Eur J Neurosci* **2016**, *44*, 2114–2119, doi:10.1111/ejn.13275.
28. Patel, N.A.; Moss, L.D.; Lee, J.-Y.; Tajiri, N.; Acosta, S.; Hudson, C.; Parag, S.; Cooper, D.R.; Borlongan, C.V.; Bickford, P.C. Long Noncoding RNA MALAT1 in Exosomes Drives Regenerative Function and Modulates Inflammation-Linked Networks Following Traumatic Brain Injury. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 204, doi:10.1186/s12974-018-1240-3.
29. Adolfsson, E.; Helenius, G.; Friberg, Ö.; Samano, N.; Frøbert, O.; Johansson, K. Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells from Donors with Coronary Artery Disease; Growth, Yield, Gene Expression and the Effect of Oxygen Concentration. *Scand J Clin Lab Invest* **2020**, *80*, 318–326, doi:10.1080/00365513.2020.1741023.
30. Rehman, J.; Traktuev, D.; Li, J.; Merfeld-Clauss, S.; Temm-Grove, C.J.; Bovenkerk, J.E.; Pell, C.L.; Johnstone, B.H.; Considine, R.V.; March, K.L. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation* **2004**, *109*, 1292–1298, doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1.
31. Cho, Y.J.; Song, H.S.; Bhang, S.; Lee, S.; Kang, B.G.; Lee, J.C.; An, J.; Cha, C.I.; Nam, D.-H.; Kim, B.S.; et al. Therapeutic Effects of Human Adipose Stem Cell-Conditioned Medium on Stroke. *Journal of Neuroscience Research* **2012**, *90*, 1794–1802, doi:10.1002/jnr.23063.
32. Chen, K.-H.; Chen, C.-H.; Wallace, C.G.; Yuen, C.-M.; Kao, G.-S.; Chen, Y.-L.; Shao, P.-L.; Chen, Y.-L.; Chai, H.-T.; Lin, K.-C.; et al. Intravenous Administration of Xenogenic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSC) and ADMSC-Derived Exosomes Markedly Reduced Brain Infarct Volume and Preserved Neurological Function in Rat after Acute Ischemic Stroke. *Oncotarget* **2016**, *7*, 74537–74556, doi:10.18632/oncotarget.12902.
33. Mitchell, R.; Mellows, B.; Sheard, J.; Antonioli, M.; Kretz, O.; Chambers, D.; Zeuner, M.-T.; Tomkins, J.E.; Denecke, B.; Musante, L.; et al. Secretome of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Skeletal Muscle Regeneration through Synergistic Action of Extracellular Vesicle Cargo and Soluble Proteins. *Stem Cell Res Ther* **2019**, *10*, 116, doi:10.1186/s13287-019-1213-1.
34. Zhu, M.; Liu, Y.; Qin, H.; Tong, S.; Sun, Q.; Wang, T.; Zhang, H.; Cui, M.; Guo, S. Osteogenically-Induced Exosomes Stimulate Osteogenesis of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Cell Tissue Bank* **2021**, *22*, 77–91, doi:10.1007/s10561-020-09867-8.
35. Zhao, C.; Chen, J.-Y.; Peng, W.-M.; Yuan, B.; Bi, Q.; Xu, Y.-J. Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells Promote Chondrogenesis and Suppress Inflammation by Upregulating MiR-145 and MiR-221. *Mol Med Rep* **2020**, *21*, 1881–1889, doi:10.3892/mmr.2020.10982.

Tkanivové inžinierstvo – základné princípy a perspektíva pre modernú medicínu

Martina ČULENOVÁ

Panara a.s., Krškanská 21, 949 05 Nitra

Súhrn

Tkanivové inžinierstvo bolo definované ako interdisciplinárny odbor aplikujúci princípy inžinierstva, medicíny a prírodovedeckých disciplín za účelom vytvorenia bio-arteficiálnych tkanív. Kombinuje rôzne typy buniek, skafoldov a bioaktívnych molekúl. Cieľom tohto prehľadového článku je poskytnúť stručný prehľad najčastejšie využívaných buniek, rastových faktorov a skafoldov v tkanivovom inžinierstve a v regeneračnej medicíne.

Kľúčové slová: tkanivové inžinierstvo, kmeňové bunky, rastové faktory, skafoldy, regenerácia

Tissue engineering - basic principles and perspective for modern medicine

Summary

Tissue engineering has been defined as an interdisciplinary field applying the principles of engineering, medicine and natural science disciplines in order to create bio-artificial tissues. It combines different types of cells, scaffolds and bioactive molecules. The aim of this review article is to provide a brief overview of the most commonly used cells, growth factors and scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine.

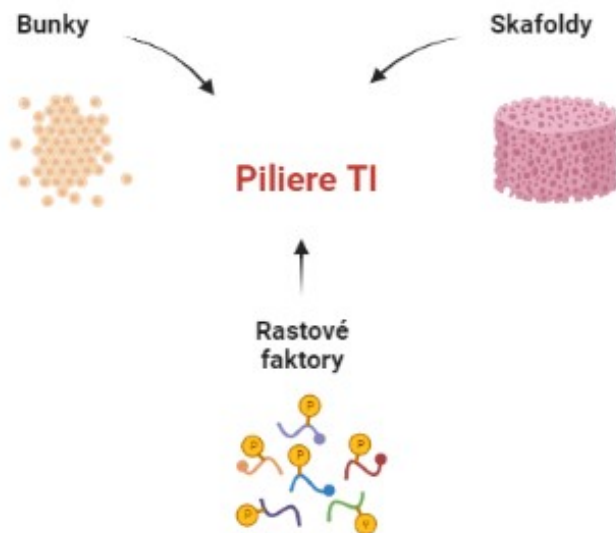
Keywords: tissue engineering, stem cells, growth factors, scaffolds, regeneration

Úvod

Tkanivové inžinierstvo (TI), ako nový a samostatný vedecký odbor, bolo definované v 90-tych rokoch minulého storočia doktormi Langerom a Vacantim. Opisujú ho ako interdisciplinárny odbor aplikujúci princípy inžinierstva a prírodovedeckých disciplín za účelom vytvorenia bio-arteficiálnych tkanív, ktoré by slúžili na reparáciu poškodených orgánov ľudského tela [1]. Ich prevratný experiment bol predstavený širokej verejnosti v roku 1997 a spočíval vo vyhotovení náhrady ľudského ucha na chrbte laboratórnej myši. Použili kravské chondrocyty vysiate na biodegradovateľný polymér, ktorý aplikovali do podkožia a nechali ho dozrieť až do finálnej podoby [2].

Veľké poškodenie a strata funkčného tkaniva predstavujú vážne problémy postihujúce ľudské telo ako celok. Napriek tomu, že moderná medicína neustále vylepšuje manažment chorôb spôsobujúcich závažné tkanivové malfunkcie, napr. svalovina srdca po infarkte, tkanivo mozgu poškodené cievnu príhodou, poškodená stena močovej trubice zasiahnutá fibrotickými procesmi, výsledný efekt je často neuspokojivý a pacienti musia podstupovať opakované chirurgické zákroky [3]. Tie ale spúšťajú kaskádu patofyziologických procesov, ktoré v konečnom dôsledku vedú k ďalšiemu poškodeniu tkaniva. Hlavným cieľom TI je preto navodiť tkanivovo špecifické regeneračné mechanizmy a indukovať liečebný proces bez veľkého zásahu do ľudského tela [4]. Jeho ďalší aplikačný potenciál predstavuje modelovanie rôznych fyziologických, ako aj patologických procesov v in vitro podmienkach. Zároveň

umožňuje lepšie porozumieť a detailnejšie skúmať regulačné mechanizmy mnohých chorobných stavov [5]. TI sa opiera o využitie a kombináciu rôznych druhov buniek, materiálov a regulačných molekúl (Obr.1) [6].



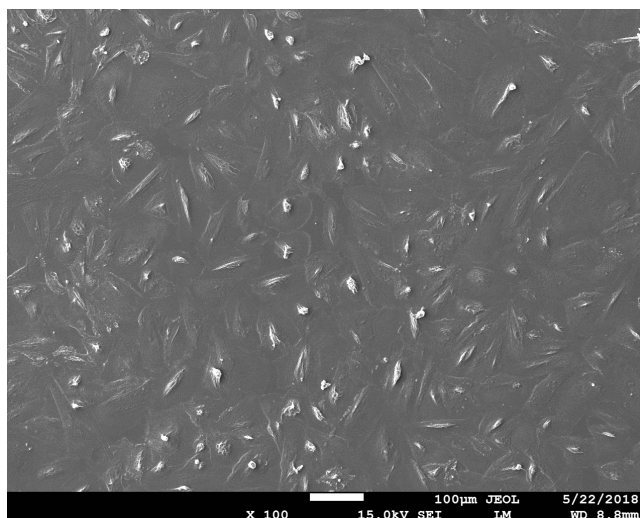
Obr. 1. Základné piliere tkanivového inžinierstva: bunky, skafoldy a rastové faktory.

Bunky

Bunky predstavujú jeden z najdôležitejších pilierov TI. Ideálnym zdrojom z imunologického hľadiska sú bunky autológne, izolované zväčša z bioptického tkaniva daného pacienta (napr. fibroblasty z bukálnej sliznice) [7]. Negatíva tohto prístupu predstavujú invazívny zákrok za účelom biopsie, ktorý často vedie k vytvoreniu jazvy v mieste odberu, ako aj limitovaná veľkosť tkaniva, ktoré pacientovi môže byť odobraté. Preto sa v súčasnosti výskumy s veľkým záujmom zameriavajú na kmeňové bunky, ktoré majú unikátne biologické vlastnosti a aj z malého množstva bioptickej vzorky vedia vytvoriť masívne bunkové kultúry [8]. Založenie bunkových kultúr pre potreby TI zahŕňa nasledovné procesy: odobratie vzorky so zdrojom buniek, izolácia buniek, založenie primokultúr, expanzia buniek a ich cielená diferenciácia [9]. Aby bunky v in vitro podmienkach dobre rástli, potrebujú mať stabilné prostredie s presne definovanou teplotou, pH, koncentráciou oxidu uhličitého, osmolaritou. Dôležitý je aj správny výber kultivačného média, rastových a diferenciálnych faktorov [10]. Následne sa bunky aplikujú za účelom výskumu v in vivo podmienkach.

Medzi špecifické vlastnosti kmeňových buniek patrí vysoká miera schopnosti samooobnovovania, klonogenita a diferenciácia do požadovaných bunkových línií [11]. Ďalšou unikátnou črtou je ich imuno-modulačný účinok [12]. Vedia uvoľňovať do extracelulárneho prostredia množstvo regulačných molekúl, ktoré priamo interferujú s imunitným systémom (v zmysle imunosupresie) a súčasne potencujú regeneráciu poškodených tkanív [13,14]. Tým sa stávajú taktiež atraktívnym zdrojom pre výskum nových možností terapie autoimunitných ochorení. Najčastejšie používaným typom sú tzv. mezenchymálne kmeňové bunky derivované z tuky, kostnej drene, pupočníkového tkaniva, ale aj alternatívne zdroje akými sú kmeňové bunky derivované z moču (Obr.2) [15,16]. Tie sa vďaka možnosti neinvazívneho odobratia vzorky (spontánne vylúčený moč), jednoduchej a lacnej izolácii a expanzii dávajú v súčasnosti do popredia v rámci bunkového výskumu. Aby sa kmeňové bunky mohli kategorizovať ako mezenchymálne, musia spĺňať požadované kritéria: adhérenca na plastové povrchy, prítomnosť špecifických povrchových antigénov (CD73, CD90, CD105) a kapacita

trojlíniovej diferenciácie na osteoblasty, adipocyty a chondroblasty v in vitro podmienkach [17].

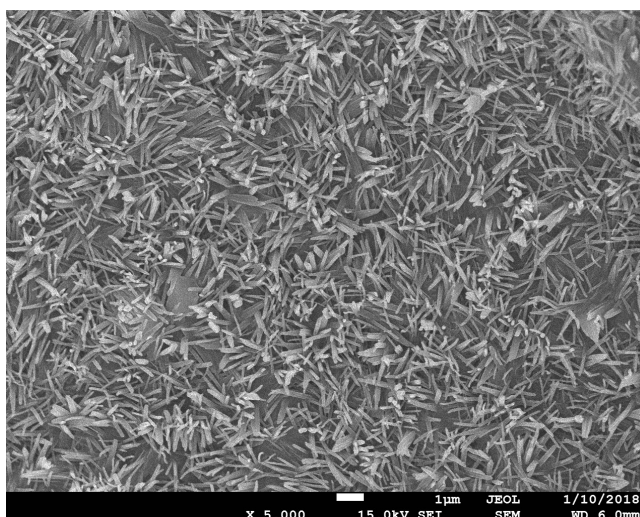


Obr. 2. Mesenchymálne kmeňové bunky derivované z moču.

Skafoldy

V kontexte aplikácie kmeňových buniek a reparácie poškodených orgánov zohrávajú dôležitú úlohu tzv. skafoldy. Jedná sa o špecificky nadizajnované matrice zväčša polymérneho pôvodu (syntetické, ale aj prírodné polyméry), ale môžu byť vyhotovené aj z keramiky, kovu alebo kompozitných materiálov [18].

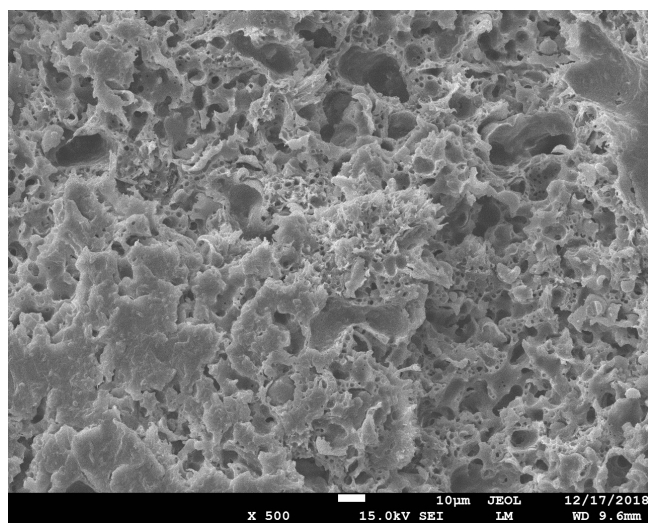
Medzi prírodné polyméry radíme kolagén, fibrín, alginát, hyaluronan, škrob, acelulárnu dermu a pod. Ich potenciálna aplikácia sa javí v rámci TI mäkkých tkanív (Obr.3) [19]. Syntetické polyméry reprezentuje kyselina polymliečna, polykaprolaktonát, kyselina polyglykolová, a.i. Výskumy so spomínanými polymermi sa často zameriavajú na TI kože, chrupavky, kosti, ciev [20]. Kalcium fosfát, trikalcium fosfát a hydroxyapatit patria medzi keramické materiály využívané najmä na reparáciu poškodeného kostného tkaniva [21].



Obr. 3. Skafold na báze prírodného polyméru (kolagén).

Mechanické, fyzikálne a biologické vlastnosti predurčujú jednotlivé materiály na špecifické aplikácie v rámci TI a regeneratívnej medicíny. Vo všeobecnosti môžeme povedať,

že skafoldy, ktoré sú z daných materiálov vyrábané, vytvárajú mechanickú oporu, o ktorú sa bunky vedú efektívne prichytiť, umožňujú bunkám proliferovať, diferencovať a interagovať s okolitým nepoškodeným tkanivom [22]. Aby mohli byť aplikovateľné do živých organizmov (in vivo), skafoldy musia byť biokompatibilné (netoxické), biodegradovateľné a dobre sterilizovateľné [23]. Dôležitú úlohu zohráva aj ich makro- a mikro-štruktúra, ktoré sú kľúčové pri vysievaní skafoldov bunkami. Zásadnú charakteristiku skafoldov predstavuje aj porozita (Obr. 4). Póry v materiáli umožňujú bunkám prísun nutrientov, proliferáciu, migráciu a taktiež parakrinnú signalizáciu. Uľahčujú prerastanie ciev do tkanivového konštruktu [24]. Na druhej strane, príliš veľká porozita sa môže odraziť na zhoršených mechanických vlastnostiach matrice. Preto rovnováha medzi mechanickou stabilitou a porozitou skafoldu je kľúčová v rámci aplikácie v TI. V závislosti od aplikácie, veľkosť pórov sa zvyčajne pohybuje v rozmedzí 50-300 mikrometrov [25].



Obr. 4. Porézna vnútorná štruktúra skafoldu umožňujúca dobré prichytenie a prerastanie buniek. Umožňuje aj transport látok a neovaskularizáciu

Viacere výskumy potvrdili, že regenerácia tkanív vysiatymi skafoldami je oveľa efektívnejšia ako aplikácia samotných buniek alebo nevysiatych matric do miesta poškodenia [22]. Tieto tkanivové konštrukty umožňujú jednak lepšiu chirurgickú manipuláciu pri aplikácii in vivo, ako aj neovaskularizáciu, transport nutrientov a migráciu buniek v rámci novo vznikajúceho tkaniva. Adhéziu buniek na povrch skafoldu radíme k fyzikálno-chemickej reakcii sprostredkovanú špecifickými proteínmi (integrínmi) [26]. Na uchytenie čo najväčšieho množstva buniek vplýva taktiež hydrofóbnosť, náboj a drsnosť povrchu, na ktorý bunky adherujú [27]. Bezprostredne po uchytení bunky menia svoju morfológiu- oplošťujú sa, aby ich cytoplazmatická membrána interagovala s čo najväčšou plochou matrice [28]. Následne dochádza k vytvoreniu špecifických adhézných komplexov, ktoré spájajú extracelulárnu matrix s intracelulárnymi aktínovými filamentami prostredníctvom integrínov. Týmto mechanizmom sa bunka pevne uchyť na povrch skafoldu [29]. Najnovšie trendy v rámci výskumu a vývoja nových materiálov sa zameriavajú na modifikáciu skafoldov tak, aby čo najviac podporili základné biologické funkcie bunky akými sú adhézia, proliferácia či diferenciácia na ich povrchu [30]. Umožňuje to naviazanie špecifických proteínov a rastových faktorov na skafold. Zároveň by mala byť zabezpečená aj kontrolovaná degradácia

(biodegradácia) matrice, aby v konečnom dôsledku ostali v tkanive len bunky s prirodzeným skafoldom- extracelulárnou matrix [22].

Rastové faktory

Ďalší pilier TI predstavujú rastové faktory. Jedná sa o polypeptidy, ktoré sa prirodzene vyskytujú v živých organizmoch [31]. Ich kľúčovou úlohou je modulácia biologických vlastností buniek prostredníctvom prísne regulovaných biochemických dráh [32]. Rastové faktory sú syntetizované vo forme prekursorov a zohrávajú zásadnú úlohu v reparačných procesoch prebiehajúcich v ľudskom organizme [33]. Prenášajú informácie medzi bunkami a extracelulárnou matrix, stimulujú endogénne reparačné mechanizmy, regulujú mitózu, chemotaxiu, diferenciáciu, génovú expresiu ako aj angiogézu [34]. Zúčastňujú sa taktiež pri zápalových a imuno-modulačných procesoch [35]. Medzi základných predstaviteľov tejto skupiny patria PDGF (platelet derived growth factor), TGF (transforming growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), CSF (colony stimulating factor), IGF (insulin growth factor), atď.

Diskusia a záver

Orgány v ľudskom tele predstavujú 3D štruktúry uložené v dynamickom prostredí. Kvôli týmto faktom sa na vývoj najmodernejších skafoldov čoraz viac využívajú tzv. 3D tlačiarne, prípadne biotlačiarne. 3D tlačiareň umožňuje precízne vyhotovenie skafoldu tak, aby čo najlepšie mimikoval fyziologickú štruktúru reparovaného tkaniva a zároveň replikoval extracelulárnu matrix a poskytoval potrebnú mechanickú podporu [36]. Biotlačiarne využívajú špeciálny bio-atrament, ktorý pozostáva z koktailu buniek, materiálu a rastových faktorov [37]. Ten je priamo vrstvený do požadovaného tvaru. Pre klinickú medicínu predstavuje potenciál v zmysle nanášania buniek priamo do miesta poškodenia (napr. biotlač kožných náhrad na lôžku pacienta). Bioreaktory sú zariadenia, ktoré dokážu v laboratórnych podmienkach simulovať prostredie aké sa nachádza v živom organizme, a to prostredníctvom parametrov akými sú teplota, tlak, koncentrácia kyslík a oxidu uhličitého, osmolarita [38]. Umožňujú ovplyvňovať novovznikajúce tkanivo rôznymi biologickými, chemickými a fyzikálnymi stimulmi [39].

Potenciál TI v modernej medicíne spočíva najmä vo vyhotovení tzv. umelých (bioartifických orgánov). Jedná sa o orgány, ktoré vznikli v laboratórnych podmienkach a sú aplikovateľné do ľudského organizmu s cieľom nahradiť čiastočne alebo úplne poškodený pôvodný orgán [40]. Tento prístup by mohol výrazne zlepšiť kvalitu života pacientov. Vďaka princípom TI vieme v súčasnosti vyhotoviť náhrady kože, kosti, svaloviny (hladkej ako aj priečne pruhovanej), chrupavky, šliach, močového mechúra, močovej rúry, dýchacej sústavy, pankreasu, pečene či obličiek [41]. Aj napriek obrovskému množstvu sľubných výsledkov, len málo štúdií sa dokázalo preklenúť z animálnych modelov na aplikáciu v klinickej medicíne. Dôvodom je finančná, ako aj časová náročnosť daných experimentov spolu s malým množstvom pacientov zahrnutých do klinických štúdií. Avšak umelé orgány, prípadne ich miniatúrne a zmenšené formy- organoidy, našli veľké využitie aj v laboratórnych podmienkach najmä v rámci výskumu a vývoja nových liečiv [42].

Pod'akovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby z operačného programu Integrovaná infraštruktúra, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (ITMS2014+: 313011V358).

Zoznam použitej literatúry

1. Sándor GK. Tissue engineering: Propagating the wave of change. *Ann Maxillofac Surg*. 2013;3(1):1-2. doi:10.4103/2231-0746.110058.
2. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100(2):297-302.
3. MacArthur, B., Oreffo, R. Bridging the gap. *Nature* 433, 19 (2005). <https://doi.org/10.1038/433019a>.
4. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-30. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257. PMID: 22432625.
5. He J, Zhang X, Xia X, Han M, Li F, Li C, Li Y, Gao D. Organoid technology for tissue engineering. *J Mol Cell Biol*. 2020 Aug 1;12(8):569-579. doi: 10.1093/jmcb/mjaa012. PMID: 32249317; PMCID: PMC7683016.
6. de Kemp V, de Graaf P, Fledderus JO, Ruud Bosch JL, de Kort LM. Tissue engineering for human urethral reconstruction: systematic review of recent literature. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118653.
7. Culenova M, Ziaran S, Danisovic L. Cells Involved in Urethral Tissue Engineering: Systematic Review. *Cell Transplant*. 2019;28(9-10):1106–1115. doi:10.1177/0963689719854363.
8. Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. *Elsevier Inc*. 2014;4:41-57. ISBN 978-0-12-398358-9.
9. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*. 2011 May 6;(51):2720. doi: 10.3791/2720. PMID: 21587162; PMCID: PMC3197119.
10. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to cell culture. *Methods Mol Biol*. 2012;806:1-13. doi: 10.1007/978-1-61779-367-7_1. PMID: 22057441.
11. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5(5):362-9.
12. Bartholomew A. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol*. 2002;30(1):42 – 48. doi: 10.1016/S0301-472X(01)00769-X.
13. Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol*. 2000; (63): 198–216. doi: [10.1111/prd.12024](https://doi.org/10.1111/prd.12024).
14. Shawki S, Gaafar T, Erfan H, El Khateeb E, El Sheikha A, El Hawary R. Immunomodulatory effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Microbiol Immunol*. 2015;6(59): 348–356. doi: [10.1111/1348-0421.12259](https://doi.org/10.1111/1348-0421.12259).
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317.
16. Huang YZ, He T, Cui J, Jiang YL, Zeng JF, Zhang WQ, Xie HQ. Urine-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine: Basic Biology, Applications, and Challenges. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022 Oct;28(5):978-994. doi: 10.1089/ten.teb.2021.0142. Epub 2022 Jan 18. PMID: 35049395.
17. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14. doi: 10.3727/096368910X. PMID: 21396235.
18. Jantová S, Bakoš D. Bunkové kultúry a tkanivové inžiniersvto. Bratislava, STU 2019. p. 112-119. ISBN: 978-80-227-3204-8.
19. Sell SA. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. *Polymers*. 2010; 2:522-553.
20. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int. J. Polym. Sci*. 2011, 19 pages. doi: 10.1155/2011/290602.
21. Chang CH, Lin CY, Liu FH, Chen M, Lin CP, Ho HN, Liao YS. 3D Printing Bioceramic Porous Scaffold with Good Mechanical Property and Cell Affinity. *PLoS One*. 2015;10(11): e0143713.

22. Culenova M, Bakos D, Ziaran S, Bodnarova S, Varga I, Danisovic L. Bioengineered Scaffolds as Substitutes for Grafts for Urethra Reconstruction. *Materials (Basel)*. 2019 Oct 22;12(20):3449. doi: 10.3390/ma12203449. PMID: 31652498; PMCID: PMC6829564.
23. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013 Dec;19(6):485-502. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437. Epub 2013 Jun 25. PMID: 23672709; PMCID: PMC3826579.
24. Hollister S. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Mater*. 2005;4:518–524. doi: 10.1038/nmat1421.
25. Takahashi Y, Tabata Y. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym*. 2004;15:41. doi: 10.1163/156856204322752228.
26. Chen H, Liu Y, Jiang Z, Chen W, Yu Y, Hu Q. Cell-scaffold interaction within engineered tissue. *Exp. Cell Res*. 2014; 323:346–351. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.028.
27. Chang HI, Wang Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. In: Eberli D (ed) *Regenerative medicine and tissue engineering - cells and biomaterials*, chapter 27. InTech, Rijeka, Croatia, pp 569– 588. doi: 10.5772/21983.
28. Wei J, Sun XQ, Hou BX. Evaluation of Silk Fibroin-RGD-Stem Cell Factor Scaffold Effect on Adhesion, Migration, and Proliferation of Stem Cells of Apical Papilla. *Stem Cells Int*. 2021 May 10;2021:6612324. doi: 10.1155/2021/6612324. PMID: 34046070; PMCID: PMC8128554.
29. Matsui T, Arima Y, Takemoto N, Iwata H. Cell patterning on polylactic acid through surface-tethered oligonucleotides. *Acta Biomater*. 2015 Feb;13:32-41. doi: 10.1016/j.actbio.2014.11.011. Epub 2014 Nov 12. PMID: 25462847.
30. Zhou T, Benda C, Dunzinger S. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*. 2012;7:2080–2089. doi: 10.1038/nprot.2012.115.
31. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*. 2008;17(4):467-479. doi: 10.1007/s00586-008-0745-3.
32. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5): 585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
33. Ding T, Kang W, Li J, Yu L, Ge S. An in situ tissue engineering scaffold with growth factors combining angiogenesis and osteoimmunomodulatory functions for advanced periodontal bone regeneration. *J Nanobiotechnology*. 2021 Aug 17;19(1):247. doi: 10.1186/s12951-021-00992-4. PMID: 34404409; PMCID: PMC8371786.
34. Pearson RG, Bhandari R, Quirk RA, Shakesheff KM. Recent Advances in Tissue Engineering. *J Long Term Eff Med Implants*. 2017;27(2-4):199-231. doi: 10.1615/JLongTermEffMedImplants.v27.i2-4.70. PMID: 29773040.
35. Guan N, Liu Z, Zhao Y, Li Q, Wang Y. Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. *Drug Deliv*. 2020 Dec;27(1):1438-1451. doi: 10.1080/10717544.2020.1831104. PMID: 33100031; PMCID: PMC7594870.
36. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2016 Aug;40:103-112. doi: 10.1016/j.copbio.2016.03.014. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27043763.
37. Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. 2020 Jan;226:119536. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536. Epub 2019 Oct 11. PMID: 31648135.
38. Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. *TechnolHealthCare*. 2011;19: 55 –69. doi: 10.3233/THC-2011-0605.
39. Partap S, Plunkett NA, O'Brien FJ. Bioreactors in Tissue Engineering. Available from: <https://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/bioreactors-in-tissue-engineering>.
40. De Bartolo L, Mantovani D. Bioartificial Organs: Ongoing Research and Future Trends. *Cells Tissues Organs*. 2022;211(4):365-367. doi: 10.1159/000518251. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34348257.

41. Pien N, Palladino S, Copes F, Candiani G, Dubruel P, Van Vlierberghe S, Mantovani D. Tubular Bioartificial Organs: From Physiological Requirements to Fabrication Processes and Resulting Properties. A Critical Review. *Cells Tissues Organs*. 2022;211(4):420-446. doi: 10.1159/000519207. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34433163.
42. Ren X, Chen W, Yang Q, Li X, Xu L. Patient-derived cancer organoids for drug screening: Basic technology and clinical application. *J Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug;37(8):1446-1454. doi: 10.1111/jgh.15930. Epub 2022 Jul 7. PMID: 35771719

Umelá inteligencia a jej využitie pri spracovávaní vedeckej literatúry o COVID-19

Michal IVANTYSYN¹, Dagmar VACLAVIKOVA¹, Peter MUSIL²

¹APEL, Dunajská 52, 811 08 Bratislava, Slovensko; ²Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Špitálska 24, 811 08 Bratislava

Súhrn

Pandémia COVID-19 viedla vo viacerých disciplínach k bezprecedentnému zrýchleniu vedeckej produkcie. Obrovské množstvo dostupných publikácií sťažuje zdravotníckym pracovníkom a výskumníkom držať krok so súčasným stavom vedomostí o COVID-19. Tento článok predstavuje covid19-help.org. ako bezplatnú databázu spravovanú odborníkmi, navrhnutú na zvýšenie dostupnosti relevantných originálnych údajov súvisiacich s liečbou a prevenciou COVID-19 prostredníctvom imunizácie. Na urýchlenie procesu identifikácie relevantných pôvodných vedeckých publikácií a na zjednodušenie anotácie ich obsahu využíva databáza ako nástroj umelú inteligenciu v lekárskej literatúre (AIM.lit). Článok poskytuje prehľad o návrhu databázy covid19-help.org, kritériách používaných na výber publikácií a používaní nástroja AIM.lit. Databáza umožňuje používateľom jednoducho vyhľadávať a filtrovať záznamy, poskytuje stručné informácie o jednotlivých látkach a ich mechanizmoch účinku, uvádza relevantné pôvodné vedecké publikácie s anotáciami a ponúka odkazy na externé zdroje. Nástroj AIM.lit zvyšuje rýchlosť výberu publikácie a extrakcie základných relevantných informácií bez toho, aby bola ohrozená validita dát. Technológia a skúsenosti získané pri vytváraní databázy covid19-help.org a jej nástrojov by mohli byť užitočné aj v iných oblastiach, kde je organizácia vedeckých informácií výzvou.

Kľúčové slová: COVID-19; spracovanie literatúry; AI

Use of artificial intelligence in processing of COVID-19-related scientific literature

Summary

The COVID-19 pandemic has led to an unprecedented acceleration of scientific production in several disciplines. The sheer volume of available publications makes it difficult for healthcare professionals and researchers to keep up with the current state of knowledge about COVID-19. This article is presented by covid19-help.org. as a free, expert-managed database designed to increase the availability of relevant original data related to the treatment and prevention of COVID-19 through immunization. To speed up the process of identifying relevant original scientific publications and to simplify the annotation of their content, the database uses artificial intelligence in medical literature (AIM.lit) as a tool. The article provides an overview of the design of the covid19-help.org database, the criteria used to select publications and the use of the AIM.lit tool. The database allows users to easily search and filter records, provides brief information on individual substances and their mechanisms of action, lists relevant original scientific publications with annotations, and offers links to external resources. The AIM.lit tool increases the speed of publication selection and extraction of essential relevant information without compromising data validity. The technology and experience gained in the creation of the covid19-help.org database and its

tools could also be useful in other areas where the organization of scientific information is a challenge.

Keywords: depressive disorder, anxiety disorder, diagnosis, neuropeptides, markers

Úvod

Pandémia COVID-19 uvalila na zdravotníckych pracovníkov a poskytovanie zdravotnej starostlivosti bezprecedentnú záťaž [1]. Vo všeobecnosti sa vedecká produkcia v biomedicíne rýchlo zvyšuje. V databáze PubMed je každý rok indexovaných viac ako 1 milión článkov, pričom tento počet sa každoročne zvyšuje o 8 – 9 % [2]. V reakcii na pandémiu došlo k extrémnemu zrýchleniu vedeckej produkcie naprieč rôznymi disciplínami. V súčasnosti je v PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=COVID-19>) indexovaných viac ako 350 000 publikácií spojených len s kľúčovým slovom „COVID-19“. Zložitosť a objem údajov bráni preťaženým zdravotníckym pracovníkom, ako aj výskumníkom, získať komplexné pochopenie súčasného stavu poznatkov o manažmente tohto ochorenia.

Niekoľko medzinárodných iniciatív zhromažďuje údaje z výskumu týkajúce sa COVID-19 a umožňuje ich ďalšiu analýzu používateľmi [3]. Jednoduchý prístup k prakticky využiteľným informáciám je však často komplikovaný absenciou anotácií, nedostatočnými alebo príliš všeobecnými definíciami kritérií pre zaradenie článkov do databázy, redundanciou dát alebo potrebou pokročilých data miningových nástrojov na extrakciu informácií.

Naša bezplatná databáza covid19-help.org bola navrhnutá tak, aby zvýšila dostupnosť relevantných údajov pre zdravotníkov, vedcov a širokú verejnosť. Cieľom covid19-help.org je skrátiť čas potrebný na identifikáciu relevantných pôvodných vedeckých publikácií (prezentujúcich údaje o účinnosti látok vo vzťahu k liečbe COVID-19 alebo prevencii infekcie SARS-CoV-2 prostredníctvom imunizácie) a ich záverov. Aby bol tento prístup uskutočniteľný, vyvinuli a aplikovali sme modely umelej inteligencie (AI), ktoré pomáhajú pri výbere výskumného článku a výbere textu.

Databáza covid19-help.org

Pred vypuknutím COVID-19 sme vybudovali databázu zbierajúcu vedecké údaje o účinnosti terapií cystickej fibrózy s ohľadom na mutácie spôsobujúce ochorenie (<https://cf-help.org/>). Explózia počtu vedeckých prác o COVID-19 [4] nás inšpirovala využiť naše skúsenosti a vytvoriť covid19-help.org.

Počet publikovaných recenzovaných prác bezprostredne po vypuknutí pandémie bol obmedzený. V našej databáze boli preto uvedené aj relevantné predtlače, ktoré boli po ukončení procesu peer-review postupne nahradené finálnymi verziami. Do polovice roku 2020 bolo k dispozícii dostatok recenzovaných prác. Na zabezpečenie kvality sa pre covid19-help.org zvažovali iba publikácie indexované v databáze LitCovid. LitCovid indexuje publikácie od PubMed súvisiace s COVID-19 [5].

Covid19-help.org prezentuje iba publikácie spĺňajúce definované kritériá: i) otvorený prístup k plnému textu v angličtine; ii) publikácia poskytuje experimentálne alebo pozorovacie údaje o účinnosti definovanej látky (alebo skupiny látok) pri liečbe COVID-19 alebo prevencii (závažnej) infekcie SARS-CoV-2 imunizáciou; iii) predmetné údaje sú pôvodné (t. j. predtým nezverejnené, okrem predtlačových serverov). Tento filter zaisťuje, že publikácie, ktoré sú irelevantné, neprístupné alebo neposkytujú pôvodné experimentálne

alebo pozorovacie výsledky, sú eliminované a prehliadanie súboru údajov pre používateľa je výrazne zjednodušené.

Pracovný postup pri publikovaní záznamu na covid19-help.org je nasledovný: i) identifikácia publikácie na základe výberových kritérií; ii) vyhodnotenie a anotácia obsahu; iii) prepojenie zápisu so záznamami definovaných látok. Ak sa záznam na covid19-help.org nenájde, vytvorí sa.

Databáza covid19-help.org umožňuje používateľom jednoducho vyhľadávať a filtrovať záznamy o látkach, referenciách alebo iných komponentoch databázy, ktoré poskytujú všeobecné alebo zaujímavé informácie súvisiace s COVID-19. Databáza poskytuje stručné všeobecné informácie o jednotlivých látkach (vrátane synonym, komerčných produktov alebo chemických štruktúr) a popisuje mechanizmus ich účinku a úroveň dôkazov týkajúcich sa ich predpokladanej anti-COVID-19 aktivity. Uvádzajú sa odkazy na externé zdroje informácií (napr. PubChem, DrugBank alebo Wikipedia). Záznam látky uvádza, kedy bolo schválené používanie látky vybranými regulačnými orgánmi pre lieky (Európska agentúra pre lieky, The Food and Drug Administration alebo Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency) a ak sú k dispozícii, ponúka odkazy na registrované klinické štúdie (ClinicalTrials.gov).

Použitie AI pri výbere textu

Pôvodne bola identifikácia publikácií vykonávaná odborníkmi výlučne manuálne. Vzhľadom na narastajúci objem vedeckej produkcie, ako aj rozširovanie anotácií, sme však vyvinuli modely AI, ktoré tento proces urýchľujú. AI umožňuje identifikáciu relevantných publikácií na základe definovaných kritérií pomocou ich abstraktov alebo dokonca názvov, ak abstrakty nie sú dostupné. Senzitivita týchto modelov v procese validácie bola viac ako 94 % a presnosť bola viac ako 90 %. Anotáciu publikácií ďalej urýchľuje model AI, ktorý pomáha identifikovať kľúčové vety v texte, ktoré stručne sumarizujú výsledky. Na základe validačných štúdií súčasný model dosahuje senzitivitu 85 % s mierou falošnej pozitivity pod 43 %. Tento model sa stále zdokonaľuje a dúfame, že znížime mieru falošnej pozitivity pod 20 % bez obmedzenia senzitivity. Odhadujeme, že súčasné modely skrátiť čas potrebný na extrakciu požadovaných základných informácií z LitCovid o 80 % bez toho, aby bola ohrozená platnosť údajov.

Testovacia sada všetkých referencií dostupných na spracovanie (hromadný export z LitCovid dostupný do júna 2022) obsahovala 245 822 referencií. Na základe našej definície relevantnosti AI identifikovala 30 086 článkov ako relevantných prostredníctvom abstraktu a ďalších 1 128 prostredníctvom názvu, v prípadoch, ak abstrakt nebol dostupný. To znamená, že odhadom 12,7 % článkov obsahuje pôvodné údaje spĺňajúce kritériá na zaradenie do databázy covid19-help.org.

Kľúčovým obsahom priradeným k jednotlivým látkam je zoznam relevantných pôvodných publikácií, ktoré sú zoradené podľa toho, či ich závery podporujú alebo sú v rozpore s predpokladom, že daná látka má potenciál na liečbu alebo prevenciu (závažného) COVID-19. Väčšina publikácií je stručne anotovaná (napr. informáciami o výsledkoch, súvisiacich variantoch SARS-CoV-2, dávkovaní alebo veľkosti vzorky). K dispozícii sú štítky, ktoré identifikujú typ štúdie, typ testovaných látok, závažnosť COVID-19 v hodnotenej vzorke pred liečbou a mnoho ďalších parametrov.

K marcu 2023 poskytujeme evidenciu 1647 látok, z ktorých 501 sa už používa pri liečbe iných ochorení. Covid19-help.org uvádza zoznam rôznych kategórií látok, od malých molekúl cez biopolyméry a definované zmesi až po bunkové produkty. Uvedené publikácie poskytujú rôzne úrovne dôkazov, od modelovania interakčných štruktúr in silico cez in vitro a

zvieracie modely až po klinické štúdie. Zahrnuté štúdie sa zameriavajú na aktivitu látok v rôznych fázach infekcie, vrátane prevencie infekcie humorálnou imunitou, inhibíciu internalizácie vírusových častíc bunkovým mechanizmom, inhibíciu replikácie vírusu proteínmi kódovanými vírusmi alebo potlačenie nadmernej zápalovej reakcie vyvolané infekciou SARS-CoV-2.

Údaje v databáze covid19-help.org sú voľne dostupné, exportovateľné vo formátoch .xls a .csv a prístupné na použitie inými softvérovými nástrojmi prostredníctvom API. Len za jeden rok v roku 2022 prilákala stránka covid19-help.org viac ako 17 000 používateľov zo všetkých obývaných kontinentov.

Zhrnutie

Napriek dostupnosti vakcín a vybraných antivirov [6,7] je vzhľadom na pretrvávajúce riziko vzniku rezistentných variantov SARS-CoV-2 [8] potrebné pokračovať v intenzívnom výskume a vývoji bezpečných a účinných farmakologických nástrojov pre prevenciu a liečbu COVID-19. Možnosti liečby a imunizácie sú potrebné najmä pre zraniteľné skupiny obyvateľstva [9]. Kontinuálne mapovanie vedeckých výstupov v tejto oblasti preto zostáva nevyhnutné pre správne epidemiologické a individuálne rozhodovanie. Skúsenosti získané pri vytváraní databázy covid19-help.org a jej nástrojov, vrátane modelov AI, by sa dali uplatniť aj v iných oblastiach, kde organizácia vedeckých informácií obmedzuje rozvoj poznania.

PodĎakovanie

Článok vznikol vďaka podpore z projektu „Vývoj a implementácia imunomodulačnej bunkovej terapie v boji proti pandémie COVID-19“ v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra, projekt ITMS2014 kód: 313011ATT8.

Zoznam použitej literatúry

1. Gnanapragasam, S. N., Hodson, A., Smith, L. E., Greenberg, N., Rubin, G. J., & Wessely, S. (2022). COVID-19 survey burden for health care workers: Literature review and audit. *Public Health*, 206, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2021.05.006>
2. Landhuis, E. (2016). Scientific literature: Information overload. *Nature*, 535(7612), Article 7612. <https://doi.org/10.1038/nj7612-457a>
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2020, October 9). COVID-19 Databases and Journals. Stephen B. Thacker CDC Library. <https://www.cdc.gov/library/researchguides/2019novelcoronavirus/databasesjournals.html> (accessed 13/04/2023)
4. Riccaboni, M., & Verginer, L. (2022). The impact of the COVID-19 pandemic on scientific research in the life sciences. *PLOS ONE*, 17(2), e0263001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263001>
5. Chen, Q., Allot, A., & Lu, Z. (2021). LitCovid: An open database of COVID-19 literature. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1534–D1540. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa952>
6. Li, M., Wang, H., Tian, L., Pang, Z., Yang, Q., Huang, T., Fan, J., Song, L., Tong, Y., & Fan, H. (2022). COVID-19 vaccine development: Milestones, lessons and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00996-y>
7. Singh, M., & de Wit, E. (2022). Antiviral agents for the treatment of COVID-19: Progress and challenges. *Cell Reports Medicine*, 3(3), 100549. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100549>
8. Chakraborty, C., Bhattacharya, M., & Sharma, A. R. (2022). Emerging mutations in the SARS-CoV-2 variants and their role in antibody escape to small molecule-based therapeutic resistance. *Current Opinion in Pharmacology*, 62, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.11.006>

9. Salasc, F., Lahlali, T., Laurent, E., Rosa-Calatrava, M., & Pizzorno, A. (2022). Treatments for COVID-19: Lessons from 2020 and new therapeutic options. *Current Opinion in Pharmacology*, 62, 43–59. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.11.002>

Interakcie polymérnych skafoldov s hostiteľským imunitným systémom

Martina ČULENOVÁ

Panara a.s., Krškanská 21, 949 05 Nitra

Súhrn

Imunitný systém zohráva kľúčovú úlohu v udržiavaní homeostázy živých organizmov. Jeho dysfunkcia spôsobuje závažné stavy, akými sú ťažké infekcie, alergie, onkologické či autoimunitné ochorenia. Správne fungovanie imunity je taktiež nevyhnutné pre prijatie tkanivového konštruktu vyhotoveného v in vitro podmienkach. Aplikácia polymérnych skafoldov in vivo spúšťa kaskádu imunitných reakcií, ktoré môžu v nepriaznivom prostredí vyústiť až do tvorby fibrotickej kapsule. Preto sa v súčasnosti výskumy zameriavajú na vývoj imuno-modulačných matric, ktoré by svojimi vlastnosťami dokázali stimulovať imunitný systém prijímateľa v zmysle reparácie poškodeného tkaniva.

Kľúčové slová: imunitný systém, polyméry, skafoldy, imunitná reakcia, tkanivové inžinierstvo

Interaction between polymer-based scaffolds and host immune system

Summary

The immune system plays a crucial role in maintaining of the homeostasis in the living organisms. Its dysfunction leads to severe infections, allergies, as well as oncological or autoimmune diseases. In the context of the tissue engineering, adequate intervention between host immune system and tissue-engineered implant is necessary. When the scaffold is applied in vivo, series of immune reactions are triggered which can result in the formation of the fibrotic capsule around the implant. Because of this, many researches are focused on the engineering of immuno-modulatory scaffolds which could enhance endogenous pro-regenerative mechanisms.

Keywords: immune system, polymers, scaffolds, foreign body reaction, tissue engineering

Úvod

Ľudské telo je neustále vystavované mnohým patogénom a cudzím molekulám. To, v akej miere poškodia organizmus, je determinované odpoveďou imunitného systému. Z morfológického hľadiska predstavuje imunitný systém difúziu, interaktívnu sieť pozostávajúcu z lymfatických orgánov, buniek, humorálnych faktorov a cytokínov [1]. Základnou úlohou tohto systému je ochraňovať organizmus pred všetkými činiteľmi (infekčného ako aj neinfekčného pôvodu), ktoré narúšajú jeho homeostázu. Dysfunkcia imunity vedie k závažným infekciám, alergiám, nádorovým či autoimunitným ochoreniam [2]. Jej správna aktivita je taktiež jedným z kľúčových faktorov pre úspešnú aplikáciu tkanivových konštruktov vytvorených v rámci tkanivového inžinierstva. Ich implantácia za účelom reparácie poškodených tkanív a orgánov predstavuje intervenčný zásah, na ktorý okamžite reaguje imunita daného pacienta. Tá určuje, v akej miere sa spustia reparačné a regeneračné mechanizmy [3]. Ak je odpoveď imunitného systému neprimeraná, dochádza k odvrhnutiu tkanivových konštruktov a tento fenomén predstavuje jeden z hlavných problémov ich aplikácie v rutinej medicínskej praxi. Práve preto je potrebné, aby základné

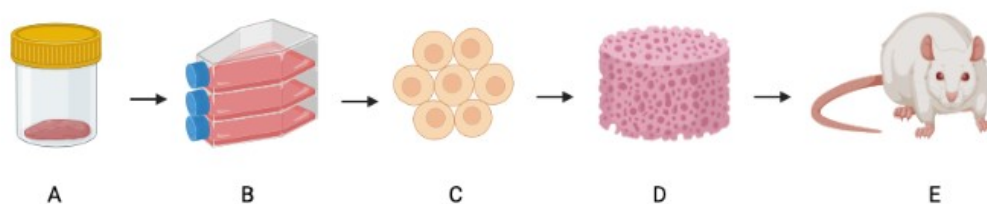
zložky, ktoré aplikuje tkanivové inžinierstvo (najmä polymérne materiály vo forme skafoldov a bunky), potencovali fyziologické správanie imunity.

Skafoldy

V rámci tkanivového inžinierstva predstavujú skafoldy špecifické matrice, ktoré vytvárajú 3D štruktúru pre uchytenie, proliferáciu, diferenciáciu buniek a spoločne vytvárajú tkanivové konštrukty vhodné na regeneráciu poškodených tkanív (Obr.1) [4]. Materiály, z ktorých sa skafoldy vyrábajú, môžeme stručne rozdeliť na prírodné, syntetické materiály a keramiku [5]. Aby mohli byť aplikovateľné do živého organizmu, musia spĺňať nasledovné podmienky:

1. Biokompatibilita – charakterizuje ju správna interakcia medzi skafoldom, vysiatými bunkami a príjemcom. Bunky musia na maticu dobre adherovať, zachovať si pôvodné funkcie, majú viesť migrovať v rámci 3D štruktúry, diferencovať sa a produkovať novú extracelulárnu maticu. Skafold po implantácii *in vivo* nesmie navodiť systémovú zápalovú reakciu a nemal by byť odvrhnutý imunitným systémom;
2. Biodegradácia – implantovaná matica najskôr slúži ako lešenie podporujúce prichytenie a proliferáciu buniek. Avšak je žiadúce, aby sa aj kontrolovane odbúraval, a tým umožnila, aby vysiate bunky spolu s pribúdajúcou extracelulárnou maticou poskytl efektívnu regeneráciu poškodenému tkanivu. Dôležité je, aby uvoľnené degradačné produkty taktiež vykazovali netoxickosť;
3. Mechanické vlastnosti – mechanické vlastnosti skafoldu by mali rešpektovať základné anatomicke, ako aj biofyzikálne špecifiká tkanív, do ktorých sa implantujú. Tieto požiadavky predstavujú veľkú výzvu v rámci výskumu a vývoja polymérnych skafoldov. Správne mechanické vlastnosti matrice taktiež umožňujú dobrú chirurgickú manipuláciu;
4. Štruktúra skafoldu – porézna štruktúra vyznačujúca sa navzájom poprepájanými pórami je kľúčová požiadavka z hľadiska efektívnej proliferácie a distribúcie buniek nielen na povrchu, ale aj vo vnútorných štruktúrach skafoldu;
5. Správna technológia výroby – správne zvolená technológia výroby dokáže zaistiť produkciu kvalitného tkanivového konštruktu. Najčastejšie používané sú electrospinning, 3D tlač, biotlač [6].

Avšak ani splnenie vyššie spomínaných požiadaviek nezaručuje prijatie daného materiálu živým organizmom. Všetko je podmienené sériou reakcií, ktoré spúšťa imunitný systém príjemcu.



Obr. 1. Inžinierstvo tkanivového konštruktu. A: bioptická vzorka tkaniva slúžiaca ako zdroj buniek, ktoré sa z nej izolujú. B: tkanivové kultúry derivované z izolovaných buniek. C: disociácia buniek z tkanivových kultúr. Získané bunky sa následne vysádzajú na pripravený skafold. D: porézny skafold. 3D štruktúra a poprepájané póry predstavujú ideálne podmienky na kolonizáciu bunkami a vytvorenie tkanivového konštruktu. E: Vysiate skafoldy podliehajú maturácii, ideálne v dynamickom prostredí. Následne sa aplikujú do živého organizmu za účelom rekonštrukcie poškodeného tkaniva.

***In vivo* odpoveď na aplikáciu polymérnych skafoldov**

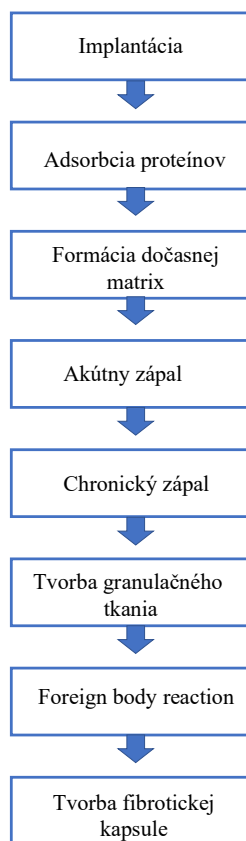
Implantácia polymérnych skafoldov do živého organizmu aktivuje špecifické dráhy navodzujúce zápalovú, ako aj regeneračnú reakciu, nakoľko sa do postihnutého prostredia uvoľňujú pro- a proti-zápalové regulačné molekuly [7]. Pomer medzi týmito zložkami udáva, či sa tkanivo efektívne zregeneruje a zahojí, alebo sa vyvinie chronická zápalová reakcia ústiaca do extenzívnej fibrotizácie (vytvorenie tzv. fibrotickej kapsule) [8]. Toto štádium sa v odbornej literatúre nazýva ako tzv. „*foreign body reaction*“ (reakcia na cudzie teleso). Nakoľko polymérny skafold predstavuje cudzie teleso implantované *in vivo*, porozumenie tohto fenoménu objasnilo, prečo mnohé matrice aj pri vynikajúcich výsledkoch z *in vitro* prostredia nenaplnili očakávania po aplikácii do živých organizmov.

„*Foreign body reaction*“ predstavuje chronickú zápalovú reakciu na cudzie teleso v živom organizme. Charakteristickou črtou tohto fenoménu je prítomnosť tzv. „*foreign body giant cells*“, ktoré vznikli fúziou makrofágov [8]. Nasledujúci text v skratke opisuje patofyziológiu tohto javu (Obr. 2).

Implantácia skafoldu navodí v organizme akútnu zápalovú reakciu. Priľahlé kapiláry sú dilatované a do postihnutého miesta sa uvoľňujú z poškodených buniek a extracelulárnej matrix cytokíny spolu s tzv. „*DAMPS*“ (damage-associated molecular patterns), ktoré iniciujú a udržiavajú neinfekčnú zápalovú odpoveď. Súčasne sa bielkoviny krvnej plazmy adsorbujú na povrch implantovaného skafoldu a spúšťajú koagulačnú dráhu, ktorá vedie k vytvoreniu dočasnej matrix nachádzajúcej sa v okolí a na povrchu skafoldu [9]. Aktivované sú taktiež imunitné bunky, najmä neutrofily a mastocyty. Tie secernujú ďalšie cytokíny a regulačné molekuly, ktoré priťahujú k miestu poškodenia ďalšie imunitné bunky, napr. makrofágy, B-lymfocyty, T-lymfocyty, NK-bunky [10]. Akútna fáza zápalu trvá približne 3-7 dní a bunky prirodzenej, ako aj špecifickej imunity sa snažia cudzí materiál degradovať. Avšak väčšina polymérnych skafoldov sa za danú dobu nevie v organizme úplne degradovať, čím sa navodzuje chronická zápalová odpoveď. Typickými bunkami pre túto fázu sú makrofágy a „*foreign body giant cells*“, ktoré hrajú kľúčovú úlohu vo formácii finálnej fibrotickej kapsule okolo skafoldu. Výskumy potvrdili aj prítomnosť lymfocytov, avšak ich rola nie je v súčasnosti dostatočne objasnená [11]. Mieru fibrotizácie ovplyvňuje aktuálny biochemický status postihnutého miesta, ktorý takisto podmieňuje schopnosť makrofágov polarizovať sa na bunky podporujúce regeneráciu tkanív (M2 fenotyp), alebo naopak na fenotyp spúšťajúci ďalšie zápalové procesy (M1 fenotyp) [12]. Pre úspešnú implantáciu polymérneho skafoldu je preto nevyhnutné, aby v rámci interakcie s hostiteľským imunitným systémom prevažovali pro-regeneračné mechanizmy. Preto sa súčasné výskumy, zaoberajúce sa skafoldami, zameriavajú na tzv. imuno-modulačné vlastnosti daných polymérov. Tie by mali v podmienkach *in vivo* potencovať pro-regeneračné dráhy a uľahčiť obnovenie poškodených tkanív [13]. Preto je dôležité, aby základné parametre skafoldov, ku ktorým radíme tvar, topografiu, mikro-architektúru (porozita a veľkosť pórov), tvrdosť, hydrofóbnosť, degradačnú kinetiku, a.i. [14]. Viaceré štúdie potvrdili, že veľkosť polymérnych vlákien a ich orientácia v rámci štruktúry skafoldu ovplyvňujú polarizáciu makrofágov a mieru zápalovej reakcie v postihnutom mieste [15]–[17]. Výsledky naznačujú, že organizované vlákna s väčším priemerom potencujú makrofágy smerom k M2 polarizácii. Tento fenomén sa spozoroval aj pri skafoldoch s veľkými pórmí [18], [19]. Štúdie taktiež naznačujú, že skafoldy na báze prírodných polymérov nespôsobujú prílišnú tvorbu fibrotickej kapsule v okolí implantátu [20]. Nedávna štúdia preukázala, že aplikácia skafoldu na báze biologických polymérov potencovala expresiu antigénu CD206, ktorý je typickým determinantom M2 polarizácie makrofágov. Naopak, v skupine s aplikovanými syntetickými skafoldami sa pozorovala masívna infiltrácia neutrofilov a taktiež neboli detegované CD206 antigény [21]. Výstupy

experimentov indikujú, že na vplyv imunitnej odpovede vplýva aj samotný výber materiálu na výrobu matrice. Skafoldy na báze biologických či prírodných polymérov sa javia ako favoriti, avšak nevýhoda týchto matric spočíva v náročnej kontrole ich degradácie. Túto vlastnosť vieme dobre regulovať pri aplikácii syntetických polymérov, ale nakoľko je ich degradácia (tým pádom aj prítomnosť v organizme) dlhšia, potencujú zápalovú reakciu ústiacu do zvýraznenej fibrotizácie²⁰. Práve preto sa hybridné skafoldy na báze prírodných a syntetických polymérnych zmesí javia ako správny prístup za účelom vývoja imuno-modulačných matric [22]. Navyše, súčasné moderné technológie umožňujú takú modifikáciu syntetických skafoldov, aby potencovali pro-regeneračné mechanizmy v mieste poškodenia. Výsev kmeňovými bunkami môže prispieť k tejto požiadavke [23]. Avšak pri tomto prístupe treba brať do úvahy možnú reakciu štetu proti hostiteľovi, ktorá by predstavovala závažný nežiadúci vedľajší efekt [24]. Preto sa súčasné štúdie zameriavajú na výsev skafoldov pomocou špecifických nanočastíc derivovaných z kmeňových buniek, tzv. „exozómov“. Exozómy predstavujú extracelulárne nanočastice, ktoré pri správne navodených podmienkach dokážu potencovať procesy hojenia tkanív [25].

Aplikácia polymérnych skafoldov so schopnosťou modulácie imunitnej odpovede predstavuje veľký potenciál najmä pre regeneráciu komplikovaných a rozsiahlych tkanivových poškodení. Pochopenie reakcie imunitného systému na implantované materiály je preto kľúčové pre vývoj efektívneho tkanivového konštruktu, ktorý by pre pacienta (prijímateľa) nepredstavoval riziko, ale naopak, podporoval by správne hojenie poškodeného orgánu.



Obr 2. Schéma zobrazujúca štádia ústiace do vytvorenia fibrotickej kapsule okolo polymérneho implantátu.

Diskusia a záver

Výskum a vývoj materiálov aplikovateľných vo forme skafoldov v tkanivovom inžinierstve neustále napreduje. Tieto matrice sa zväčša vysievajú rôznymi druhmi buniek s cieľom vytvoriť 3D tkanivový konštrukt aplikovateľný na reparáciu poškodených orgánov. Tradičný prístup inžinierstva polymérnych skafoldov sa zameriaval na vyhotovenie biologicky odbúrateľnej matrice, ktorá mala po implantácii do živého organizmu zostať „biologicky neviditeľná“, a tak nevyvolať nežiadúcu imunitnú reakciu. V súčasnosti sa však táto stratégia nezdá byť opodstatnená, nakoľko je známe, že akákoľvek *in vivo* intervencia spúšťa špecifické vnútorné dráhy, ktoré vedú k navodeniu zápalovej reakcie [26]. Na základe týchto poznatkov sa predpokladá, že zápalom navodená regenerácia tkanív by mohla predstavovať efektívnejšiu stratégiu. Navyše, skafoldy by mohli modulovať a spolupracovať s imunitným systémom tak, aby všetky biochemické procesy, ktoré sa odohrávajú v mieste postihnutia, viedli k regenerácii tkanív. A práve preto pozornosť púta nový vedecký odbor, tzv. „imuno-inžinierstvo“ (immuno-engineering) [27]. Hoci sa veľa skafoldov úspešne aplikovalo *in vivo* v experimentoch, prípadne sa už používa v klinickej medicíne, post-implantačné komplikácie sú častým fenoménom. Vysoko riziková je najmä navodená rozsiahla zápalová reakcia, ktorá môže vyústiť až do zlyhania orgánov. Ako je však uvedené vyššie, úspešná implantácia do ľudského tela alebo akéhokoľvek živého organizmu úzko súvisí s odpoveďou imunitného systému hostiteľa, ktorý rozhodne, či sa transplantát prijme alebo odvrhne [20].

Imuno-inžinierstvo skúma a prispôsobuje každú zložku tkanivového inžinierstva (skafoldy, bunky, regulačné molekuly) s ohľadom na intervenciu s imunitným systémom daného jednotlivca [27]. Princíp spočíva vo vyhotovení biokompatibilného, resorbovateľného skafoldu s imuno-modulačnými účinkami, ktoré by potencovali vytváranie endogénneho pro-regeneračného prostredia v mieste poškodenia tkaniva [28]. Nakoľko zohľadňuje rozdielnosť aktivity imunitného systému medzi jednotlivcami (v závislosti od veku, pohlavia, pridružených chorôb) imuno-inžinierstvo taktiež ponúka personalizovaný prístup a vytváranie tkanivových konštruktov šitých na mieru pacienta [29]. Vedci veria, že práve implementácia tohto odboru do tkanivového inžinierstva výrazne posunie aplikáciu tkanivových konštruktov z experimentálneho prostredia do rutinej medicínskej praxe.

PodĎakovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu CEMBAM - Centrum medicínskeho bioaditívneho výskumu a výroby z operačného programu Integrovaná infraštruktúra, ktorý je spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (ITMS2014+: 313011V358).

Zoznam použitej literatúry

1. J. Parkin and B. Cohen, 'An overview of the immune system', *The Lancet*, vol. 357, no. 9270, pp. 1777–1789, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
2. S. Sattler, 'The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection', 2017, pp. 3–14. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8_1.
3. J. H. Hammel, J. M. Zatorski, S. R. Cook, R. R. Pompano, and J. M. Munson, 'Engineering in vitro immune-competent tissue models for testing and evaluation of therapeutics', *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 182, p. 114111, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.addr.2022.114111.
4. B. Bakhshandeh *et al.*, 'Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials', *Biotechnol Genet Eng Rev*, vol. 33, no. 2, pp. 144–172, Jul. 2017, doi: 10.1080/02648725.2018.1430464.
5. A. Chaudhari *et al.*, 'Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review', *Int J Mol Sci*, vol. 17, no. 12, p. 1974, Nov. 2016, doi: 10.3390/ijms17121974.

6. F. J. O'Brien, 'Biomaterials & scaffolds for tissue engineering', *Materials Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, Mar. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
7. Y. Chandorkar, R. K. and B. Basu, 'The Foreign Body Response Demystified', *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 5, no. 1, pp. 19–44, Jan. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b00252.
8. A. Carnicer-Lombarte, S.-T. Chen, G. G. Malliaras, and D. G. Barone, 'Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics', *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 9, Apr. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.622524.
9. O. Veisoh and A. J. Vegas, 'Domesticating the foreign body response: Recent advances and applications', *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 144, pp. 148–161, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.addr.2019.08.010.
10. N. Noskovicova, B. Hinz, and P. Pakshir, 'Implant Fibrosis and the Underappreciated Role of Myofibroblasts in the Foreign Body Reaction', *Cells*, vol. 10, no. 7, p. 1794, Jul. 2021, doi: 10.3390/cells10071794.
11. D. G. Barone *et al.*, 'Prevention of the foreign body response to implantable medical devices by inflammasome inhibition', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 119, no. 12, Mar. 2022, doi: 10.1073/pnas.2115857119.
12. J. Ye *et al.*, 'Promoting musculoskeletal system soft tissue regeneration by biomaterial-mediated modulation of macrophage polarization', *Bioact Mater*, vol. 6, no. 11, pp. 4096–4109, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.017.
13. J. Tan, Q.-Y. Zhang, L.-P. Huang, K. Huang, and H.-Q. Xie, 'Decellularized scaffold and its elicited immune response towards the host: the underlying mechanism and means of immunomodulatory modification', *Biomater Sci*, vol. 9, no. 14, pp. 4803–4820, 2021, doi: 10.1039/D1BM00470K.
14. P. Zhang *et al.*, 'Effect of cyclic mechanical loading on immunoinflammatory microenvironment in biofabricating hydroxyapatite scaffold for bone regeneration', *Bioact Mater*, vol. 6, no. 10, pp. 3097–3108, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.02.024.
15. A. D. Schoenenberger *et al.*, 'Macromechanics and polycaprolactone fiber organization drive macrophage polarization and regulate inflammatory activation of tendon in vitro and in vivo', *Biomaterials*, vol. 249, p. 120034, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120034.
16. X. Dong *et al.*, 'Aligned microfiber-induced macrophage polarization to guide schwann-cell-enabled peripheral nerve regeneration', *Biomaterials*, vol. 272, p. 120767, May 2021, doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120767.
17. A. D. Schoenenberger, J. Foolen, P. Moor, U. Silvan, and J. G. Snedeker, 'Substrate fiber alignment mediates tendon cell response to inflammatory signaling', *Acta Biomater*, vol. 71, pp. 306–317, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.03.004.
18. H. Zhou, Y. Xue, L. Dong, and C. Wang, 'Biomaterial-based physical regulation of macrophage behaviour', *J Mater Chem B*, vol. 9, no. 17, pp. 3608–3621, 2021, doi: 10.1039/D1TB00107H.
19. R. Liang *et al.*, 'Macrophage Polarization in Response to Varying Pore Sizes of 3D Polyurethane Scaffolds', *J Biomed Nanotechnol*, vol. 14, no. 10, pp. 1744–1760, Oct. 2018, doi: 10.1166/jbn.2018.2629.
20. A. I. P. M. Smits and C. V. C. Bouten, 'Tissue engineering meets immunoengineering: Prospective on personalized in situ tissue engineering strategies', *Curr Opin Biomed Eng*, vol. 6, pp. 17–26, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.cobme.2018.02.006.
21. K. Sadtler *et al.*, 'Divergent immune responses to synthetic and biological scaffolds', *Biomaterials*, vol. 192, pp. 405–415, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.11.002.
22. Y. Shen *et al.*, 'Electrospun acid-neutralizing fibers for the amelioration of inflammatory response', *Acta Biomater*, vol. 97, pp. 200–215, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.08.014.
23. H. Shokrani *et al.*, 'Cell-Seeded Biomaterial Scaffolds: The Urgent Need for Unanswered Accelerated Angiogenesis', *Int J Nanomedicine*, vol. Volume 17, pp. 1035–1068, Mar. 2022, doi: 10.2147/IJN.S353062.
24. A. E.-H. El-Kadiry, M. Rafei, and R. Shammaa, 'Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits', *Front Med (Lausanne)*, vol. 8, Nov. 2021, doi: 10.3389/fmed.2021.756029.

- 25.Y. Zhang *et al.*, ‘A tailored bioactive 3D porous poly(lactic-acid)-exosome scaffold with osteo-immunomodulatory and osteogenic differentiation properties’, *J Biol Eng*, vol. 16, no. 1, p. 22, Aug. 2022, doi: 10.1186/s13036-022-00301-z.
- 26.L. S. Saleh and S. J. Bryant, ‘The host response in tissue engineering: Crosstalk between immune cells and cell-laden scaffolds’, *Curr Opin Biomed Eng*, vol. 6, pp. 58–65, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.cobme.2018.03.006.
- 27.J. J. Green, ‘Immunoengineering has arrived’, *J Biomed Mater Res A*, vol. 109, no. 4, pp. 397–403, Apr. 2021, doi: 10.1002/jbm.a.37041.
- 28.V. Russo *et al.*, ‘Scaffold-Mediated Immunoengineering as Innovative Strategy for Tendon Regeneration’, *Cells*, vol. 11, no. 2, p. 266, Jan. 2022, doi: 10.3390/cells11020266.
- 29.M. Liu, M. Nakasaki, Y.-R. V. Shih, and S. Varghese, ‘Effect of age on biomaterial-mediated in situ bone tissue regeneration’, *Acta Biomater*, vol. 78, pp. 329–340, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.06.035.

Translačný výskum v onkológii - Skúsenosti Jednotky translačného výskumu LF UK a NOÚ

Katarína KALÁVSKÁ^{1,2}, Michal MEGO^{1,2,3}

¹Jednotka translačného výskumu Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Národného onkologického ústavu, Univerzita Komenského v Bratislave, Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovenská republika; ²Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika; ³II. Onkologická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Národného onkologického ústavu, Univerzita Komenského v Bratislave, Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovenská republika

Súhrn

Translačný výskum sa v posledných rokoch stáva čoraz skloňovanejším výrazom v biomedicínskom výskume. Translačný výskum možno chápať ako most prepájajúci základný a klinický výskum, a to prenosom poznatkov získaných v rámci základného výskumu do klinickej praxe, ako aj, spätne, objasňovaním klinicky významných otázok s využitím experimentálnych modelových systémov in vitro a in vivo. Translačný výskum v onkológii významnou mierou participuje na zlepšovaní preventívnych, diagnostických i liečebných modalít.

Kľúčové slová: translačný výskum; biomedicínsky výskum; biobanka; vzorky biologického materiálu

Translational research in oncology - Experiences of the Translational Research Unit

Summary

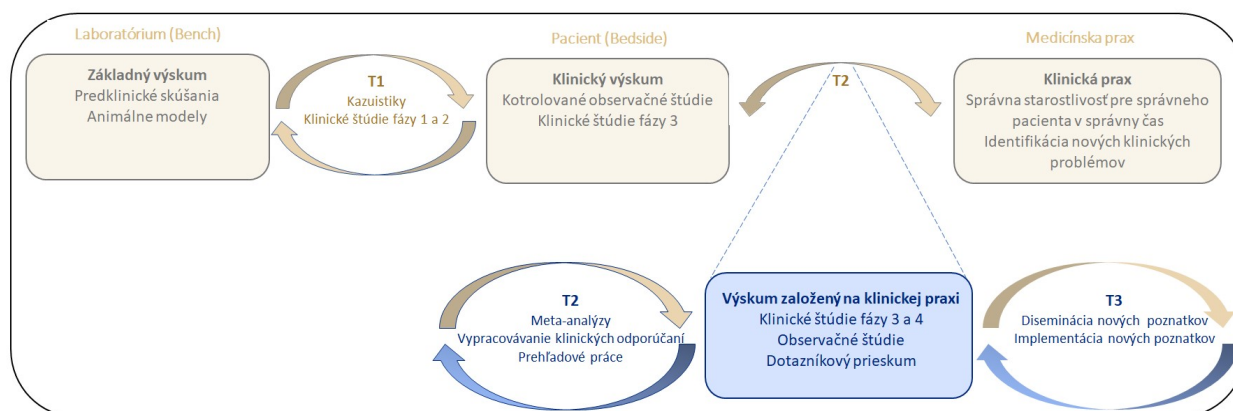
Translational research has become an increasingly popular term in biomedical research in recent years. Translational research can be understood as a bridge connecting basic and clinical research, by transferring the knowledge gained in basic research into clinical practice, as well as, in turn, clarifying clinically important questions using in vitro and in vivo experimental model systems. Translational research in oncology significantly participates in the improvement of preventive, diagnostic and treatment modalities.

Keywords: translational research; biomedical research; biobank; samples of biological material

Úvod

V databáze PubMed bolo označenie “translačný výskum “ prvý raz použité v roku 1950. Exponenciálny nárast používania tohto slovného spojenia v biomedicínskych časopisoch zaznamenávame od roku 2000. Poslaním translačného výskumu je vytvárať prepojenie medzi základným a predklinickým, resp. klinickým výskumom a medicínskou praxou. Premosťuje “priepasť” medzi základnými biologickými vedami a klinickou medicínou [1]. Medzinárodná pracovná skupina Translational Research Working Group – TRWG definuje translačný výskum ako výskum transformujúci vedecké poznatky získané v laboratórnych podmienkach, klinických alebo populačných štúdií do klinickej praxe, výsledkom čoho je zníženie incidencie, morbidít a mortality na nádorové ochorenia.

Translačný výskum možno rozdeliť do dvoch základných domén, a síce T1 doménu (bench – to – bedside) umožňujúcu transfer poznatkov zo základného výskumu do praxe a T2 doménu slúžiacu implementáciu dát získaných v rámci klinických štúdií do každodennej medicínskej praxe (Obrázok 1) [1,2].



Obr. 1. Translačný výskum – schématické znázornenie (upravené podľa Ghoshal, 2017 [2]).

Esenciálnou súčasťou translačného výskumu je riadený tok informácií a dát o jedincoch zaradených do jednotlivých klinických štúdií do výskumných pracovísk a laboratórií. Multidisciplinárny charakter, úroveň a rozsah translačného výskumu nastoluje potrebu zavedenia novej úrovne kooperácie medzi klinickým pracoviskom, výskumným laboratóriom a archiváciou kolektovaných údajov.

V biomedicínskej praxi sa popisujú dve základné skupiny faktorov, tzv. “externé” a “interné”, vplyvom ktorých môže dojsť k narušeniu kontinua vyššie spomínaného toku dát. Externé faktory sú fokusované najmä na jedincov zapojených do procesu translačného výskumu, ktorých aktivita môže byť ovplyvňovaná nedostatkom financií, či nedostatočnou komunikáciou medzi výskumnými pracovníkmi a klinikmi, resp. zákonnými regulácie biomedicínskeho výskumu. Práve klinickí pracovníci zohrávajú kľúčovú úlohu v iniciácii a koordinácii translačného výskumu. Na základe ich medicínskych znalostí a skúseností sú schopní identifikovať klinicky významné problémy, ktorých objasnenie následne presiahne bežnú klinickú prax a realizuje sa v spolupráci s biológmi, biochemikmi, štatistikmi a ďalšími profesiami na experimentálnych modeloch. Preto nedostatočná informovanosť klinických pracovníkov o prebiehajúcich translačných štúdiách a najnovších pokrokoch v biomedicínskom výskume môže spomaľovať transláciu poznatkov základného výskumu do medicínskej praxe [3]. Taktiež vypracovávanie adekvátnych klinických odporúčaní môže predstavovať jednu z kľúčových oblastí translačného výskumu [4]. Nedostatočná implementácia výsledkov základného výskumu môže byť taktiež ovplyvňovaná nedostatočným prístupom klinikov k vedeckým výsledkom [5], ako aj nepublikovaním dôležitých negatívnych výsledkov [6].

Tzv. interné faktory zahŕňajú vedecko-výskumných pracovníkov, technologických architektov a vývojárov [7,8,9]. Viacero autorov tiež poukazuje na potrebu zavedenia nových experimentálnych modelov (organoidy, PDX (Patient derived xenograft) model) do translačného výskumu [10].

Je potrebné podotknúť, že translačný výskum má v porovnaní so základným i klinickým výskumom určité špecifiká. Dôležitým predpokladom kvalitného translačného

výskumu je dostupnosť vhodného biologického materiálu získaného od skúmanej populácie pacientov. Môžno povedať, že kvalita translačného výskumu sa do značnej miery odvíja od kvality použitého biologického materiálu. Kvalita biologického materiálu potrebného pre výskum je závislá na kvalite dielčích procesov spadajúcich do manažmentu kvality zahŕňajúcich indikáciu odberov, predanalytické spracovanie odobratého biologického materiálu, jeho charakterizácia, anonymizované označenie a katalogizácia, či následná archivácia, pravidelná kontrola kvality skladovaného biologického materiálu a jeho kontrolovaný výdaj spolu s relevantnými klinickými dátami pre biomedicínsky výskum vhodnému subjektu spĺňajúcemu a zaručujúcemu dodržanie etických a legislatívnych procesov a integrity poskytnutých dát. V tomto kontexte má nepostrádateľný význam budovanie biobánk a ich prepájanie s translačným výskumom.

Biobanky predstavujú sofistikovaný a vysokoorganizovaný systém zbierok vzoriek biologického materiálu, ich programovanej a dlhodobej archivácie, doplnený o relevantné klinicko-patologické, epidemiologické a biomolekulárne informácie [11,12].

Biobanking sa stal v posledných dynamicky sa rozvíjajúcou oblasťou zaznamenávajúcou rapidný progres. V súčasnosti predstavuje rozvinutú a dobre štruktúrovanú multidisciplinárnu odvetvu, ktorá úzko spätá s vývojom a pokrokom dosiahnutými v oblasti prediktívnej, preventívnej a personalizovanej medicíny. V neposlednom rade je význam biobánk pre biomedicínsky výskum, presonalizovanú liečbu a poskytovateľov zdravotnej starostlivosti zdôrazňovaný poprednými vedeckými osobnosťami a odborníkmi na medicínsku prax [13,14].

V roku 2010 bola na pôde Národného onkologického ústavu a II. onkologickej kliniky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave vybudovaná Jednotka translačného výskumu (ako prvé pracovisko svojho druhu na Slovensku). V roku 2019 sa následne z prostriedkov Národného onkologického programu podarilo zriadiť biobanku v Národnom onkologickom ústave (NOÚ). Oba typy pracovísk sa stali súčasťou systému klinickej práce na Národnom onkologickom ústave, a preto je potrebné, aby boli klinickí a vedecko-výskumní pracovníci dostatočne informovaní o systéme práce na týchto kooperujúcich pracoviskách. Zosumarizovali sme niekoľko základných bodov vyplývajúcich z našich skúseností získaných pri realizácii translačných štúdií na Jednotke translačného výskumu a Biobanke NOÚ, a ktoré, ako dúfame, môžu byť nápomocné pre kolegov v plánujúcich traslačné štúdie.

Inklúzne kritériá pre zaradenie pacienta do vybranej translačnej štúdie by mali byť jednoznačne definované a do maximálnej možnej miery zjednodušené, aby sa minimalizovalo riziko nezariadenia potenciálne vhodných pacientov. Javí sa výhodnejšie, aby inklúzne kritériá boli v prvom kroku definované voľnejšie a selektované podskupiny (z klinického hľadiska významné) budú následne analyzované ex post.

Kritickým bodom procesu biobankovania je informovaný súhlas. Každý pacient zaradený do translačnej štúdie musí byť informovaný o podmienkach vstupu do translačnej štúdie a podpísať informovaný súhlas. Je preto potrebné, aby na štúdiách participovali klinickí pracovníci, ktorí majú kontakt s pacientom a ku ktorým má pacient dôveru a ktorí cítia zodpovednosť za pacienta.

Pre dostatočný nábor pacientov do jednotlivých translačných štúdií je potrebné vytvoriť vhodné podmienky zabezpečujúce kontinuálny odber biologického materiálu a jeho následné predanalytické spracovanie, kde sa jediným určujúcim kritériom stáva dostupnosť pacienta vhodného pre zaradenie do štúdie. Väčšina analýz v rámci translačných štúdií vyžaduje čerstvý biologický materiál, resp. jeho okamžité spracovanie, príp. vo veľmi krátkom čase, napríklad do dvoch hodín, z dôvodu zachovania bioaktívnych molekúl v archivovanom materiáli. V prípade nekonzistentnosti predanalytického spracovania

kolektovaného biologického materiálu, by sa táto diskrepancia mohla negatívne premietnuť do kvality výsledných laboratórnych analýz. Pri plánovaní odberu vzoriek je preto vhodné zaradiť odber biologického materiálu v rámci translačných štúdií medzi štandardne medicínske postupy a snažiť sa tak minimalizovať prácu navyše pre zdravotníckych pracovníkov.

Pri označovaní jednotlivých alikvotov archivovaných v rámci translačných štúdií je v súlade s právnymi úpravami nevyhnutné použiť anonymizované značenie, ktoré však okrem základných identifikačných údajov musí spĺňať podmienku reprodukovateľnosti. Tiež je potrebné zohľadniť skutočnosť, že vzorky sú archivované pri teplotách -80 °C, resp. -196 °C a preto je potrebné použiť štítky odolávajúce ultranízke teplotám.

Zber vzoriek predstavuje dlhodobý proces, a preto je pri dizajnovaní translačných štúdií potrebné počítať s časovým horizontom jedného až dvoch rokov, počas ktorých sme schopní kolektovať dostatočne veľký súbor vzoriek vhodných na analýzu.

Limitujúcim kritériom je tiež množstvo archivovaného biologického materiálu, a preto je potrebné vopred stanoviť priority plánovaných analýz. Rovnako, analytická validita testu musí byť daná ešet pre samotnou analýzou.

Taktiež správna klinická prax na úrovni najnovších medicínskych poznatkov je nevyhnutná pre relevanciu klinicko-patologických dát prislúchajúcim ku kolektovaným a archivovaným vzorkám biologického materiálu. Bez týchto dát je výskumná hodnota odobratého biologického materiálu významne limitovaná. Klinická anotácia k biobankovanému materiálu je kľúčová pre translačný výskum, ako i pre samotné biobankovanie, bez nej má biobankovaný materiál veľmi obmedzenú výskumnú hodnotu.

Na základe vyššie uvedeného možno skonštatovať, že biobankovanie a translačný výskum predstavujú dynamicky sa rozvíjajúce odvetvia vyžadujúce kooperáciu viacerých odborníkov, vrátane klinických pracovníkov, zdravotných sestier, vedcov, laborantov, bioinformatikov, IT špecialistov, ako aj odborníkov na legislatívu a bioetiku a ďalších [15]. Stávame sa svedkami pozoruhodnej implementácie znalostí translačného výskumu nádorových ochorení do klinickej praxe, čím sa posúvajú hranice ľudského poznania a prinášajú pacientom možnosť prístupu k potenciálne efektívnejším liečebným prístupom. Zavše možno spomenúť uplatnenie dát získaných celogenómovým sekvenovaním rôznych typov nádorov vo vývoji inovatívnych liečiv a diagnostických testov, či nástup imunoterapie a postupné objasňovanie komplexných interakcií prebiehajúcimi medzi nádorovými bunkami a ich mikroprostredím [2].

Záver

Záverom by sme sa chceli touto cestou poďakovať všetkým pacientom a ich príbuzným, ktorí sa rozhodli participovať na translačnom výskume, stávajú sa jeho esenciálnou súčasťou, a tým výraznou mierou prispievajú k lepšiemu poznaniu onkologických ochorení. Naše poďakovanie tiež patrí všetkým spolupracovníkom z Národného onkologického ústavu, Onkologického ústavu sv. Alžbety, Ústavu experimentálnej onkológie BMC SAV, ako i jednotlivých pracovísk LF UK a SAV, kooperácia s ktorými umožňuje úspešný priebeh takéhoto výskumu na Slovensku.

Pod'akovanie

Táto práca bola realizovaná vďaka projektu spolufinancovaného Európskou úniou “Systémová verejná výskumná infraštruktúra – biobanka pre nádorové a zriedkavé ochorenia, ITMS2014+: NFP313010AFG5”.

Použitá literatúra

1. Westfall JM, Mold J, Fagnan L. Practice-based research--"Blue Highways" on the NIH roadmap. *JAMA*. 2007 Jan 24;297(4):403-6.
2. Ghoshal A. Translational Research in Oncology: Implications for Palliative Care. *Indian J Palliat Care*. 2017 Oct-Dec;23(4):462-467.
3. Fontanarosa PB, DeAngelis CD. Basic science and translational research in JAMA. *JAMA*. 2002 Apr 3;287(13):1728.
4. Davidson A. Translational research: what does it mean? *Anesthesiology*. 2011 Nov;115(5):909-11.
5. Albani S, Colomb J, Prakken B. Translational medicine 2.0: from clinical diagnosis-based to molecular-targeted therapies in the era of globalization. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Jun;87(6):642-5.
6. Verrier ED. Translational research: is there a future? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 Jun;133(6):1409-11.
7. Kuo SH, Jackson GR. Emerging subspecialties in neurology: translational research in movement disorders. *Neurology*. 2009 Aug 25;73(8):e40-1.
8. Kahn MG, Kaplan D, Sokol RJ, DiLaura RP. Configuration challenges: implementing translational research policies in electronic medical records. *Acad Med*. 2007 Jul;82(7):661-9.
9. Belshe RB. Translational research on vaccines: influenza as an example. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Dec;82(6):745-9.
10. Lee MW, Miljanic M, Triplett T, Ramirez C, Aung KL, Eckhardt SG, Capasso A. Current methods in translational cancer research. *Cancer Metastasis Rev*. 2021 Mar;40(1):7-30.
11. Malsagova K, Kopylov A, Stepanov A, Butkova T, Sinitsyna A, Izotov A, Kaysheva A. Biobanks- A Platform for Scientific and Biomedical Research. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Jul 16;10(7):485.
12. Karol Kajo, Katarína Machálekiová, Ján Sedlák, Roman Bohovič, Lukáš Plank: Biobanking – integrálna súčasť moderného biomedicínskeho výskumu. *Onkológia*, 2016, 11(6).
13. Kinkorová J, Topolčan O. Biobanks in Horizon 2020: sustainability and attractive perspectives. *EPMA J*. 2018 Nov 23;9(4):345-353.
14. Kinkorová J. Education for future biobankers - The state-of-the-art and outlook. *EPMA J*. 2021 Mar 10;12(1):15-25. doi: 10.1007/s13167-021-00234-5.
15. Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, Incoronato M, Bevilacqua P, Messina F, Baselice S, Soricelli A, Mirabelli P, Salvatore M. Biobanking in health care: evolution and future directions. *J Transl Med*. 2019 May 22;17(1):172.
